

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE
D'ÉCHANTILLONAGE ET D'ANALYSE DES NITROSAMINES
DANS L'AIR PAR CLHP-MS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
AMINA NECHADI

NOVEMBRE 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le professeur Huu Van Tra de l'Université du Québec à Montréal (UQÀM) ainsi que Simon Aubin et Jacques Lesage de l'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et Sécurité du Travail (IRSST) pour leur encadrement, sans oublier leurs conseils, encouragements et soutien tout au long de mes deux années de maîtrise.

Mes remerciements vont aussi aux techniciennes de l'IRSST qui ont toujours été présentes pour m'aider et m'orienter. Plus particulièrement madame Marielle Carrier pour son aide, son soutien et sa grande expérience qu'elle a mis à mon service pour le bon déroulement du projet.

Je remercie aussi l'IRSST et l'UQÀM pour leur soutien financier, lequel m'a permis de me consacrer à temps plein à ce projet.

Enfin, toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement à faire avancer ce projet. Mes remerciements sont adressés aux nombreuses personnes qui ont toujours su répondre à mes questions et me conseiller. Sans oublier ma famille qui a joué un très grand rôle dans l'atteinte de mes buts.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION.....	1
I.I Les nitrosamines.....	1
I.II Toxicité des nitrosamines	2
I.III Source d'exposition aux nitrosamines.....	3
I.III.I Sources endogènes	3
I.III.II Sources exogènes	4
I.IV Valeurs de référence dans l'air.....	7
CHAPITRE I	
PROBLÉMATIQUE DES NITROSAMINES DANS LE MILIEU DE TRAVAIL	9
1.1 Bilan des connaissances.....	10
1.1.1 Échantillonneurs.....	10
1.1.2 Méthode NIOSH 2522.....	12
1.1.3 Méthode OSHA 27.....	13
1.1.4 Méthode HSE.....	14
1.1.5 Méthode INRS	15
1.1.6 Méthode IRSST.....	17
1.2 Objectif du développement de la méthode actuelle.....	19
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	22
2.1 Échantillonnage.....	22
2.1.1 Réactifs	22
2.1.2 Matériels d'échantillonnage.....	23
2.2 Analyse	30
2.2.1 Réactifs	30
2.2.2 Matériels	31

CHAPITRE III	
RÉSULTATS ET DISCUSSION	32
3.1 Désorption des nitrosamines	32
3.1.1 Optimisation des paramètres de désorption	32
3.1.2 Méthode de désorption mise au point	39
3.1.3 Méthode d'analyse	40
CHAPITRE IV	
VALIDATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE	62
4.1 Détermination de l'efficacité d'extraction/récupération (désorption)	63
4.2 Précision (Fidélité)	65
4.2.1 Réplicabilité et répétabilité	65
4.2.2 Limites de détection et de quantification	66
4.2.3 Domaine d'étalonnage et d'applicabilité	68
CHAPITRE IV	
APPLICATION DE LA MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET D'ANALYSE	
EN MILIEU DE TRAVAIL	71
5.1 CLHP-MS vs CG-DAP	71
5.1.1 Comparaison des deux méthodes	71
CONCLUSION	95
APPENDICE A	
Chromatogrammes et spectres des nitrosamines standards analysés par CLHP-MS	
(Conditions chromatographiques Tableau 3.6)	96
APPENDICE B	
Chromatogrammes d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP	
(Conditions chromatographiques Tableau 1.5)	101
APPENDICE C	
Calculs et conversions	105
APPENDICE D	
Courbe d'étalonnage pour les huit nitrosamines étudiées (Conditions	
chromatographiques Tableau 3.6)	107
RÉFÉRENCES	114

LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGE
I.1 Mécanisme de réaction des amines primaires [Berit Fostas et <i>al.</i> , 2010].....	2
I.2 Réaction de formation de nitrosamine [Berit Fostas et <i>al.</i> , 2010].....	2
1.1 Échantillonneur ThermoSorb/N TM	10
1.2 Technique de désorption des nitrosamines (1. Seringue contenant la solution de désorption, 2. ThermoSorb/N TM , 3. Solution à analyser).....	11
1.3 Tube INRS modifié.....	12
2.1 Schéma et description du prés-tube d'acide sulfamique.....	26
2.2 Schéma et description du tube adsorbant (Florisol®)	26
2.3 Schéma d'utilisation des tubes INRS modifié.....	27
2.4 Système d'échantillonnage dans une chambre de génération de nitrosamines.....	29
3.1 Comparaison des méthodes de désorption pour les huit nitrosamines	37
3.2 Forme théorique d'un pic chromatographique [Meyer, 2004].....	41
3.3 Forme théorique d'un pic chromatographique	42
3.4 Chromatogramme obtenu avec la colonne Luna® pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3).....	45
3.5 Chromatogramme obtenu avec la colonne Extend-Zorbax® pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3).....	47
3.6 Chromatogramme obtenu avec la colonne Bonus®-Zorbax pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3).....	48
3.7 Chromatogramme obtenu avec la colonne Eclipse®-Zorbax pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3).....	49
3.8 Chromatogramme obtenu avec eau-acétonitrile comme phase mobile pour un mélange des huit nitrosamines de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.4).....	51
3.9 Chromatogramme obtenu avec Eau/Méthanol comme éluant pour un mélange des huit nitrosamines de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.5).....	52

3.10 Chromatogramme obtenu avec un volume d'injection de 10 μ L (Conditions chromatographique Tableau 3.3).....	55
3.11 Schéma d'une interface d'ionisation APCI [University of Bristol, 2005].....	59
5.1 Chromatogramme d'un échantillon standard obtenu par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)	89
5.2 Chromatogramme obtenu par CG-DAP d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)	91
5.3 Chromatogramme obtenu par CLHP-MS d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 3.6)	92
5.4 Chromatogramme obtenu par CG-DAP d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)	93
5.5 Chromatogramme obtenu par CLHP-MS d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 3.6)	94
A.1 Pics chromatographique et spectres MS du NMEA et NPIP ainsi que les standards internes NDEA-d10 et NDPA-d14.....	97
A.2 Pics chromatographique et spectres MS du NPYR et NMOR ainsi que le standard interne NDEA-d10.....	98
A.3 Pics chromatographique et spectres MS du NDBA et NDPA ainsi que le standard interne NDPA-d14	99
A.4 Pics chromatographique et spectres MS du NDEA et NDMA ainsi que le standard interne NDEA-d10.....	100
B.1 Chromatogrammes d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP comparé avec un chromatogramme d'un standard (Conditions chromatographiques Tableau 1.5).....	102
B.2 Agrandissement d'une zone du chromatogramme d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)	103
B.3 Agrandissement d'une zone du chromatogramme d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)	104

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	PAGE
1.1 Conditions chromatographiques de la méthode NIOSH 2522 pour l'analyse des nitrosamines [NIOSH, 1994].....	13
1.2 Conditions chromatographiques de la méthode OSHA 27 pour l'analyse des nitrosamines [OSHA, 1985].....	14
1.3 Conditions chromatographiques de la méthode HSE pour l'analyse des nitrosamines [HSE, 2010].....	16
1.4 Conditions chromatographiques de la méthode INRS pour l'analyse des nitrosamines [INRS, 2007].....	18
1.5 Conditions chromatographiques de la méthode IRSST pour l'analyse des nitrosamines.....	20
1.6 Les huit nitrosamines déterminées par NIOSH.....	20
2.1 Matériel utilisé pour l'échantillonnage simulé et sur terrain.....	27
2.2 Liste des appareils utilisés pour l'analyse par CLHP/APCI-MS.....	31
3.1 Quantités initiales et récupérées pour chaque méthode utilisée.....	36
3.2 Les colonnes qui ont été testées lors de ce développement	44
3.3 Conditions chromatographiques utilisés lors du choix de la colonne.....	45
3.4 Conditions chromatographiques utilisés lors du choix du solvant d'élution	50
3.5 Conditions chromatographiques utilisés lors du choix du solvant d'élution	52
3.6 Paramètres optimaux pour l'analyse par CLHP des nitrosamines	57
3.7 Paramètres optimaux pour l'analyse par MS des nitrosamines.....	61
4.1 Efficacité d'extraction / récupération de nitrosamine.....	64
4.2 Pourcentage de réplicabilité / répétabilité de la méthode.....	66
4.3 Limites méthodologiques	68
4.4 Coefficients de corrélation obtenus avec une courbe d'étalonnage allant jusqu'à 2000 ng/mL	70
5.1 Comparaison des quantités obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors de trois échantillonnages simulés à l'IRSST (temps d'échantillonnage = 120 min, débit = 0,1 L/min, volume d'échantillonnage = 0,012 m ³).....	73

5.2 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Cafétéria, temps d'échantillonnage = 485 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,97 m ³)	75
5.3 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Bureau, temps d'échantillonnage = 479 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,96 m ³)	76
5.4 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de chariot élévateur clients, temps d'échantillonnage = 466 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,93 m ³)	76
5.5 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de chariot élévateur clients, temps d'échantillonnage = 474 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,95 m ³)	77
5.6 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 428 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,85 m ³)	77
5.7 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 415 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,79 m ³)	78
5.8 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 416 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,83 m ³)	78
5.9 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Cafétéria, temps d'échantillonnage = 465 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,93 m ³)	79
5.10 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Trimeuses, temps d'échantillonnage = 457 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,92 m ³)	79

5.11 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Bureau, temps d'échantillonnage = 448 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,89 m ³)	80
5.12 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de chariot élévateur, temps d'échantillonnage = 443 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,88 m ³)	80
5.13 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Poste fixe, temps d'échantillonnage = 451 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,90 m ³)	81
5.14 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Frigidaire, temps d'échantillonnage = 125 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,25 m ³)	81
5.15 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Personnel, temps d'échantillonnage = 365 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,73 m ³)	82
5.16 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Table tournante, temps d'échantillonnage = 364 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,73 m ³)	82
5.17 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 372 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m ³)	83
5.18 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Chariot élévateur, temps d'échantillonnage = 373 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,75 m ³)	83
5.19 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Découpe, temps d'échantillonnage = 375 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,75 m ³)	84

- 5.20 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Découpe, temps d'échantillonnage = 369 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)84
- 5.21 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Table tournante, temps d'échantillonnage = 370 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)85
- 5.22 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Moulage, temps d'échantillonnage = 367 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,73 m³)85
- 5.23 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Bureau, temps d'échantillonnage = 371 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)86

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2A	Agent probablement cancérigène
2B	Cancérigène possible
ACN	Acétonitrile
APCI	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
BD	Becton, Dickinson
CEPA	Loi canadienne sur la protection de l'environnement (Canadian Environmental Protection Act)
CG	Chromatographie en phase gazeuse (GC)
CIRC (IARC)	Centre International de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer)
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)
CSST	Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail
DAP	Détecteur Azote-phosphore (Détecteur NPD)
DCM	Dichlorométhane
EM	Exposition minimale
ESI	Ionisation par Électronébuliseur (ElectroSpray Ionization)
H ₃ NSO ₃	Acide sulfamique
HSE	Health and Safety Executive (UK)
INRS	Institut National de la Recherche Scientifique
IRSST	Institut de Recherche Robert Sauvé en Santé et Sécurité au Travail
LDM	Limite de Détection Méthodologique
LQM	Limite de Quantification Méthodologique
MBS	Morpholinomercaptobenzothiazole
MeOH	Méthanol
MgSiO ₃	Silicate de Magnésium

MgSiO ₃	Silicate de Magnésium
MS	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
NDBA	Nitrosodibutylamine
NDEA	Nitrosodiethylamine
NDMA	Nitrosodimethylamine
NDMA-D ₁₀	Nitrosodiethylamine-Deuté ₁₀
NDPA	Nitrosodipropylamine
NDPA-D ₁₄	Nitrosodipropylamine-Deuté ₁₄
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health (USA)
NMEA	Nitrosomethylethylamine
NMOR	Nitrosomorpholine
NPIP	Nitrosopipéridine
NPYR	Nitrosopyrrolidine
OSHA	Occupational Safety and Health Administration (USA)
SIM	Détection sélective d'un ion (Selected Ion Monitoring)
TEA	Analyseur à énergie thermique (Thermal Energy Analyser)
TMTD	Tetraméthylthiuramedisulphide
TRK	Technische Richtkonzentrationen (concentration technique de référence)
VEA	Valeur d'Exposition Admissible
VMR	Valeur Minimale Rapportée
ZDEC	zinc diéthylthiocarbamate

LISTE DES SYMBOLES

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	Microgramme par mètre cube
μL	Microlitre
μm	Micromètre
E_E	Efficacité d'extraction/ récupération
GME	Gaussienne Modifiée Exponentiellement
H	Hauteur équivalente de plateaux théoriques
L	Litre
L/min	Litre par minute
m	Mètre
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mm Hg	Millimètre de mercure
M_R	Quantité de nitrosamine récupérée après désorption
M_s	Quantité de nitrosamines ajoutées sans désorption
ng/mL	Nanogramme par millilitre
Psi	Livres par pouce carré (Pound per Square Inch)
S	Écart-type
TF	Facteur de trainée (Taling Factor)
V	Volt
v/v	Volume par volume
V_{pp}	Volt (peak to peak)
δ	Largeur du pic à mi-hauteur
ω	Largeur à la base

RÉSUMÉ

Les nitrosamines constituent une famille de composés posant un risque pour la santé des gens. Depuis la fin des années cinquante, 90% des nitrosamines ont été prouvées ou suspectées cancérogènes pour l'homme. Ces substances peuvent être retrouvées dans l'air, entre autres dans les milieux de travail. Les concentrations les plus importantes de nitrosamines volatiles ont été retrouvées dans les procédés de fabrication du caoutchouc. La valeur d'exposition admissible (VEA) recommandée par l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) dans une revue de littérature récente est de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de nitrosamines. Les faibles concentrations à analyser demandent donc des outils et des méthodes d'analyse hautement spécifiques et sensibles. Depuis 2007, les laboratoires de l'IRSST ont effectué un important développement qui a permis de mettre au point une méthode d'analyse de huit nitrosamines dans l'air par chromatographie gazeuse avec détecteur azote phosphore (GC-DAP). Cependant, cette méthode peut parfois présenter des limitations quant à sa spécificité. Le spectromètre de masse étant très sélectif et sensible à la fois, une méthode couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) a été développée dans le but de doser de basses concentrations de nitrosamines dans l'air. L'échantillonnage s'effectue avec le tube adsorbant développé par l'INRS (France). La méthode de désorption mise au point permet une récupération moyenne de $96,00 \pm 0,08 \%$. Les limites de quantification obtenues lors des validations préliminaires de la méthode d'analyse par CLHP-MS varient de $0,03 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à $0,09 \mu\text{g}/\text{m}^3$ selon la nitrosamine. Les valeurs obtenues représentent respectivement 3 % à 9 % de la norme recommandée par l'INSPQ pour 800 L de volume d'air échantillonné (400 minutes d'échantillonnage à 2 L/min). Le domaine d'applicabilité de la méthode est de $0,07 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à $1,75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ce qui couvre les concentrations visées par l'INSPQ. Les résultats démontrent une détection spécifique et sensible des nitrosamines.

Mots clés : Nitrosamines, CLHP-MS, Analyse de l'air, Caoutchouc, GC-DAP.

INTRODUCTION

I.I Les nitrosamines

Les nitrosamines constituent une famille de produits chimiques cancérigènes et mutagènes extrêmement dangereuse pour la santé et l'environnement [Fuchs et *al.*, 1995]. Ces composés ont été découverts il y a un peu plus de 100 ans, mais ce n'est qu'en 1956 que les scientifiques britanniques Barnes et Magee ont indiqué leur caractère cancérigène en découvrant la capacité tumorigène du N-nitrosodiméthylamine (NDMA) sur les animaux [Magee et Barnes, 1956]. Cette dernière a été classifiée comme un produit probablement cancérigène pour l'homme [IARC, 1978 ; 1985].

Cette découverte a mené à plusieurs autres tests effectués sur les nitrosamines. Depuis 25 ans, les composés N-nitrosés et les N-nitrosamines en particulier ont fait l'objet de nombreuses études tant sur le plan des méthodes de détection que sur le plan de leur formation ou de leur effets biologiques. Avec l'avancée technologique des instruments d'analyse chimique, environ 300 nitrosamines ont été analysées et prouvées mutagènes et cancérigènes [Preussmann, 1983].

Les N-nitrosamines, comme leur nom l'indique, comportent une fonction amine ($-NH_2$) à laquelle des groupements alkyles ou aryls et une fonction nitro ($-NO_2$) sont attachés. Elles sont produites par une réaction entre une substance contenant de l'azote et de l'acide nitreux ou des nitrites. Lorsque la substance contenant de l'azote est une amine secondaire (R_2NH), les nitrosamines formées sont relativement thermostables et volatiles [Stellman et Dufresne, 2000]. Les amines primaires peuvent réagir avec un agent nitrosé pour former aussi des nitrosamines, mais elles sont instables et se dégradent en alcools (Figure1.I).

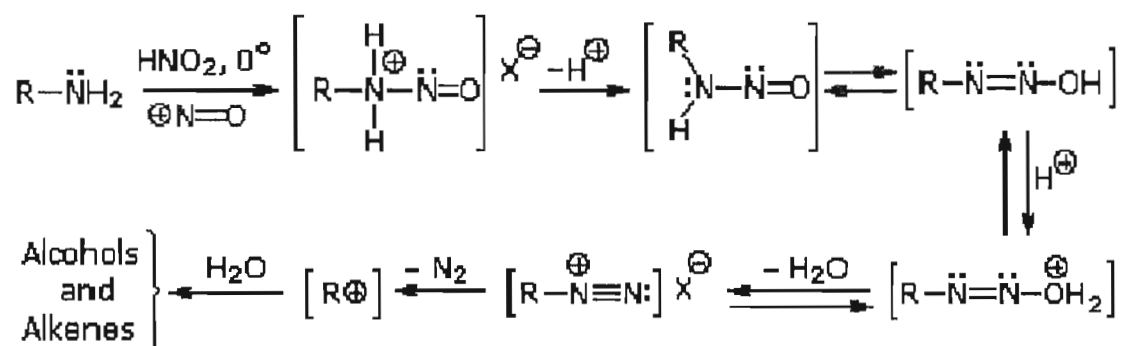


Figure 1.1 Mécanisme de réaction des amines primaires [Berit Fostas et *al.*, 2010]

Certaines conditions physico-chimiques agissent favorablement sur la cinétique de formation des nitrosamines. Elles se forment assez facilement à des concentrations potentiellement dangereuses [Spiegelhalder et Preussmann, 1982]

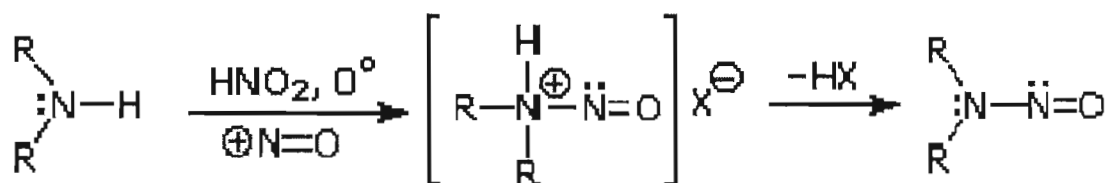


Figure 1.2 Réaction de formation de nitrosamine [Berit Fostas et *al.*, 2010]

1.2 Toxicité des nitrosamines

Les études ont démontré que les composés N-nitroso et plus précisément les nitrosamines sont mutagènes, tératogènes et cancérigènes organotropiques chez l'animal [Magee et Barnes, 1967]. Environ 300 composés N-nitroso ont été prouvés cancérigènes sur plusieurs espèces animales [Preussmann et *al.*, 1984]. Les études *in vivo* ont démontré que ces substances sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique mitochondriale [Sheweita et Mostafa, 1996].

La nitrosodiméthyleamine est hépatotoxique et sa cancérogenité résulte de la formation *in vivo* d'agents alkylants principalement CH_3^+ [Magee et Barnes, 1956 ; Magee et

Schoental, 1964]. D'autres nitrosamines peuvent induire l'apparition de cancers dans divers organes (œsophage, poumon, estomac, colon...) [Druckrey et *al.*, 1967]. Le caractère tératogène des N-nitrosamines a été détecté particulièrement au niveau du système nerveux central [Stellman et Dufresne, 2000]

Shank a émis l'hypothèse que les nitrosamines pouvaient représenter une cause principale de certains cancers humains (cancer digestif) [Shank et Newberne, 1976]. En plus de leur présence dans divers aliments, il a été démontré que les nitrosamines peuvent se transformer *in vivo* à partir de certains précurseurs, des amines secondaires et tertiaires. En outre, des dérivés de l'urée peuvent réagir avec du nitrite en milieu acide (estomac) [Reed, 1981]. Pour sa part, Mirvish a énuméré les principaux pesticides et médicaments qui donnent naissance à des dérivés nitrosos en présence de nitrite en milieu acide [Mirvish, 1975]. Des nitrosamines cancérogènes peuvent être formées dans le tube digestif, non seulement au pH acide de l'estomac mais aussi sous l'action de la flore intestinale à pH neutre, suite à l'ingestion des nitrites et d'amines secondaires ou tertiaires qui sont souvent présents dans l'alimentation ou absorbés volontairement sous forme de médicaments [Klüber et Conrad, 1998a].

1.3 Source d'exposition aux nitrosamines

Les nitrosamines proviennent de sources endogènes ou exogènes. L'exposition humaine à ces substances peut provenir de : l'alimentation, le tabagisme, les cosmétiques, et les émissions industrielles, plus particulièrement celles venant de l'industrie du caoutchouc [Tricker, 1997].

1.3.1 Sources endogènes

Les amines et les agents nitrosants qui proviennent de notre alimentation peuvent être des précurseurs qui permettent la formation des nitrosamines dans l'estomac par réaction

chimique dans le milieu acide du suc gastrique [Reed, 1981]. Ces précurseurs se retrouvent dans les aliments de salaison utilisés comme agents conservateurs, dans les amines contenues dans les viandes ou les fromages, dans les aliments conservés par le fumage des viandes et du poisson [INSPQ, 2010]. Par exemple, dans l'industrie liée à la conservation ou la transformation des poissons, les produits à base de poissons sont une source de composés aminés potentiellement nitrosables (oxyde de triméthylamine). Et le nitrile est utilisé communément comme additif permettant en particulier d'inhiber le développement de *Clostridium botulinum*, bacille responsable du botulisme [Bulushi et al., 2009]. Ces agents peuvent se retrouver aussi dans les aliments déshydratés par les gaz de combustion, tels le malt dans la bière et le whisky [Liteplo et Meek, 2002].

Afin de réduire le risque de cancer ayant comme cause les nitrosamines, certains pays industrialisés tel que le Canada ont imposé des mesures strictes aux fabricants. Grâce à ces mesures, les aliments ont une contribution mineure dans l'exposition des humains aux nitrosamines. Par exemple, en 1964, Santé Canada a interdit l'usage de nitrate pour la conservation des fruits de mer et en 1975, il imposait la réduction de l'utilisation des nitrites et interdisait l'utilisation de nitrates dans le traitement des aliments par salaison [CEPA, 1999].

1.3.2 Sources exogènes

Les principales sources extérieures sont le tabagisme, les cosmétiques ainsi que le milieu industriel.

- **Le tabagisme**

Le tabagisme est la plus importante source d'exposition non professionnelle aux nitrosamines. Les fumeurs sont fortement exposés aux nitrosamines, car d'importantes quantités de nitrosamines spécifiques au tabac se forment par nitrosation de la nicotine lors du processus de fermentation [Castonguay et al., 1983, Reichl, 1984].

- **Le milieu de travail**

Les nitrosamines se forment facilement et de différentes façons, ce qui favorise leur présence dans différents milieux de travail à des degrés variables. Dans certains cas, les agents nitrosés responsables de la transformation des amines en nitrosamines sont déjà présents dans le milieu de travail. Dans d'autres secteurs, la présence d'amines, liées à la présence souvent inévitable d'oxyde d'azote, entraîne une grande probabilité de formation des nitrosamines dans l'atmosphère [Oury B et Protois, 1997].

En 1976, un grand intérêt était porté à la présence des nitrosamines dans l'air et particulièrement dans les milieux de travail [Bretschneider et Matz, 1974]. Des études ont montré que plusieurs populations sont potentiellement exposées aux nitrosamines à des concentrations qui dépassent les normes d'exposition [Fadlallah et *al.*, 1996]. Plusieurs industries sont concernées. On peut notamment citer comme exemple :

- **Industrie des colorants**

Des nitrites et des amines sont fréquemment utilisés dans la préparation de certains colorants et peuvent donc être à l'origine de la formation de composés N-nitrosés [Stellman et Dufresne, 2000].

- **Fabrication et utilisation de diméthylhydrazine**

La diméthylhydrazine est un ergol utilisé pour la propulsion des fusées. La méthode de synthèse la plus classique utilise la réduction de la N-nitrosodiméthylamine NDMA servant dans ce cas d'intermédiaire de synthèse [Lunn, Sansone et Andrews, 1991].

- **Industrie des savons et des détergents**

Les surfactants sont des catalyseurs de nitrosation. Okun et Archer ont montré notamment que la formation de nitrosamines à partir de nitrites et de dialcylamines, en présence d'agents de surface cationiques ou non ioniques, est d'autant plus accélérée que la chaîne alcoylée est plus longue [Okun et Archer, 1976].

- **Industrie du caoutchouc**

En milieu de travail, les plus hautes concentrations de nitrosamines dans l'environnement humain ont été mesurées dans l'air ambiant des industries de produits de caoutchouc [Straif et *al.*, 1998]. Il a été clairement démontré que les N-nitrosamines sont des polluants spécifiques à l'industrie du caoutchouc [Spiegelhalder et Preussmann, 1982].

Ces nitrosamines sont générées lors du procédé de vulcanisation [Spiegelhalder et Preussmann, 1982]. Ce procédé est le processus durant lequel le caoutchouc (normal ou synthétique), après l'ajout d'autres polymères, obtient les propriétés physiques et chimiques voulues. Le caoutchouc est mélangé avec des adjuvants qui apportent notamment la structure tridimensionnelle désirée. Le mélange avec ces ajouts se fait à température élevée en utilisant par exemple un lamineur chauffé. Après un nombre de phases intermédiaires, les objets reçoivent leur formes définitives à haute température : pneus, conduites, rubans, joints...etc. [Mirvish, 1975]. Durant les étapes de vulcanisation, une nitrosation d'accélérateurs et stabilisateurs chimiques aminés par des agents nitrosants se produit. Ces accélérateurs et stabilisateurs peuvent être soit des oxydes d'azote (NO_x) présents dans l'atmosphère de l'industrie et/ou des nitrites et nitrates contenus dans les bains de sel ou de sources inconnues [Oury et *al.*, 1997 ; Iavicoli et Carelli, 2006]. Le tétraméthylthiuramedisulphide (TMTD), le zinc diéthylthiocarbamate (ZDEC) et la morpholinomercaptobenzothiazole (MBS) utilisés dans les étapes de vulcanisation sont les précurseurs utilisés dans les étapes de vulcanisation des principales nitrosamines volatiles retrouvées dans ce milieu, à savoir la nitrosodiméthylamine

(NDMA), la nitrosodiéthylamine (NDEA), et la nitrosomorpholine (NMOR). Toutefois, d'autres nitrosamines sont susceptibles d'être produites en de plus faibles quantités dans ce type d'industrie, soit la nitrosodibutylamine (NDBA), la nitrosopipéridine (NPIP) et la nitrosopyrrolidine (NPYR). Dans pratiquement toutes les industries, le NDMA est la nitrosamine la plus répandue et qui est trouvée en général en grande quantité [Fan et *al.*, 1978].

1.4 Valeurs de référence dans l'air

La plupart des nitrosamines rencontrées en milieu industriel sont classées cancérigènes confirmées pour l'homme ou cancérigènes suspectées pour l'homme. À ce titre, dans la majeure partie des pays, les législations imposent aux employeurs de réduire les niveaux d'exposition aux cancérigènes, dont les nitrosamines, aussi bas qu'il est techniquement possible de le faire, mais sans pour autant proposer une valeur limite spécifique [Protois et Oury, 1999].

La réglementation québécoise sur la santé et la sécurité du travail ne mentionne que la N-Nitrosodiméthylamine (NDMA) dans l'annexe 1 du RSST [INSPQ, 2010]. Les textes réglementaires ne mentionnent pas la valeur d'exposition admissible applicable de cette substance. On ne trouve que la mention « EM », qui signifie que l'exposition à cette substance (la NDMA) doit être réduite au minimum.

Cependant, deux valeurs qui étaient établies en Allemagne (TRK : Technische Richtkonzntrationen = concentration technique de référence) peuvent permettre d'établir des mesures préventives et métrologiques [Dutch Expert Committe, 1999]. Ces valeurs représentent les concentrations des nitrosamines présentes dans l'atmosphère :

- ✓ 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les fluides de coupe, les inhibiteurs de corrosion volatils, les industries chimiques (sauf celles citées ci-dessous) et les fonderies.
- ✓ 0,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les industries chimiques (amines) et les industries du pneu (vulcanisation)
- ✓ 0,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les industries chimiques (fibres de polyacrylonitrile), les industries du pneu (entreposage), les produits de caoutchouc et les industries du cuir.

Les N-nitrosamines sont rencontrées dans les industries du caoutchouc (processus de vulcanisation), les industries utilisant des amines secondaires, les industries de conservation et de transformation des poissons, du cuir, etc. [NIOSH, 1994].

1.5 Problématique

1.5.1 Problématique des nitrosamines dans le milieu de travail

En 2006, les évaluations environnementales effectuées par le réseau de santé publique dans cinq usines de l'Estrie ont démontré une exposition significative des travailleurs exposés aux fumées de caoutchouc. La concentration de NDMA était nettement prédominante dans la majorité des échantillons prélevés dans ces milieux. Des concentrations allant jusqu'à 17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de nitrosamines totales ont été mesurées dans l'air ambiant de ces usines en zone respiratoire des travailleurs, soit des concentrations 17 fois plus élevées que la norme recommandée [INSPQ, 2010]. Suite à ces observations, de nombreuses mesures préventives ont été mises en place à divers postes de travail au niveau de la production (ventilation, ajustement des méthodes de travail...). Ceci a été rendu possible grâce à la collaboration de la commission de la santé et de la sécurité du travail (CSST) et des équipes du réseau de santé publique en santé au travail. Ces actions ont permis d'abaisser les concentrations des nitrosamines à des niveaux inférieurs à 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les usines de production.

CHAPITRE I

PROBLÉMATIQUE DES NITROSAMINES DANS LE MILIEU DE TRAVAIL

En 2006, les évaluations environnementales effectuées par le réseau de santé publique dans cinq usines de l'Estrie ont démontré une exposition significative des travailleurs exposés aux fumées de caoutchouc. La concentration de NDMA était nettement prédominante dans la majorité des échantillons prélevés dans ces milieux. Des concentrations allant jusqu'à $17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de nitrosamines totales ont été mesurées dans l'air ambiant de ces usines en zone respiratoire des travailleurs, soit des concentrations 17 fois plus élevées que la norme recommandée [INSPQ, 2010]. Suite à ces observations, de nombreuses mesures préventives ont été mises en place à divers postes de travail au niveau de la production (ventilation, ajustement des méthodes de travail...). Ceci a été rendu possible grâce à la collaboration de la commission de la santé et de la sécurité du travail (CSST) et des équipes du réseau de santé publique en santé au travail. Ces actions ont permis d'abaisser les concentrations des nitrosamines à des niveaux inférieurs à $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les usines de production.

Cependant, l'émission de nitrosamines volatiles à partir du produit en caoutchouc refroidi, principalement en milieu d'entreposage des produits finis, demeure relativement à la santé des travailleurs, une source de préoccupations. Ainsi, sur la base des estimations de risque disponibles dans la littérature et des normes établies ailleurs dans le monde ainsi que de la notation EM, signifiant que l'exposition doit être réduite au minimum, pour la NDMA dans la réglementation québécoise, le réseau de la santé publique et la CSST jugent ces résultats préoccupant et considèrent qu'ils méritent d'être approfondis, ceci dans une perspective de prévention d'un risque potentiel de cancer à long terme [INSPQ, 2010].

Pour faire suite à cette problématique, la CSST, par le biais du réseau SST, procède actuellement à des évaluations en hygiène industrielle du milieu professionnel concerné.

1.6 Bilan des connaissances

L'objectif de cette section est d'avoir une idée des recherches et études qui ont été faites dans les années précédentes dans le domaine de l'analyse des nitrosamines. Avoir une idée de ces méthodes permet de mieux comprendre notre motivation à développer une nouvelle méthode ainsi que les étapes suivies pour le développement.

1.6.1 Échantillonneurs

1.6.1.1 *ThermoSorb/N™*

L'échantillonneur dit ThermoSorb/N™ (figure 1.3) est constitué d'une plage d'acide sulfamique et d'une plage de silicate de magnésium (Florisil®) dans un même tube. Ce tube d'échantillonnage est le plus utilisé et le plus cité dans les références, notamment dans les méthodes de NIOSH 2522 [NIOSH, 1994] et OSHA 27 [OSHA, 1985].

Le désavantage de cet échantillonneur est la matrice obtenue lors de l'échantillonnage. Étant donné que l'acide sulfamique et le florisil® ne sont pas séparés dans le tube, les contaminants qui sont dans l'air aspiré se retrouvent sans aucune sélectivité sur les adsorbants.



Figure 1.3 Échantillonneur ThermoSorb/N™

La désorption s'effectue par l'injection de la solution de désorption dans le ThermoSorb/N™. Cette technique permet le passage de la solution à travers le tube et ainsi la récupération des substances adsorbées sur le Florisil® et l'acidesulfamique dans un vial (figure 1.4).



Figure 1.4 Technique de désorption des nitrosamines (1. Seringue contenant la solution de désorption, 2. ThermoSorb/N™, 3. Solution à analyser)

De plus, étant donné le manque de précision de la méthode qui est dû à la difficulté de la manipulation, le chromatogramme obtenu après analyse contient plusieurs contaminants autres que des nitrosamines qui ont été adsorbées sur l'acide sulfamique. Ces deux points présentent une limitation de la méthode, ce qui peut causer des surestimations.

1.6.1.2 Tube INRS modifié

Cet échantillonneur est constitué de deux tubes en polypropylène connectés en parallèle l'un à l'autre (figure 1.5). Le premier tube (A), qui est le pré-tube, contient de l'acide sulfamique qui sert à capter les amines qui se trouvent possiblement dans le milieu d'échantillonnage. Ces amines peuvent contribuer à une éventuelle surestimation due à leur transformation en nitrosamines.

Le deuxième tube (B) contient environ 500 mg de Florisil® entre deux treillis.

Le contenu de ce tube sert à capter les nitrosamines qui se trouvent dans le milieu d'échantillonnage. Seul le contenu de ce tube est analysé au laboratoire.



Figure 1.5 Tube INRS modifié

La désorption s'effectue par le simple transfert du Florisil® dans un vial et l'ajout d'un volume exact de la solution de désorption avec une pipette. Le tube INRS modifié permet une désorption plus précise et la matrice obtenue est plus propre que celle obtenue généralement avec le ThermoSorb/N™, ce qui diminue les risques d'erreurs. Pour les raisons citées ci-haut, le tube INRS a été choisi pour réaliser les échantillonnages effectués à l'IRSST.

1.6.2 Méthode NIOSH 2522

Cette méthode a été développée par NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) [NIOSH, 1994]. Elle utilise la chromatographie gazeuse comme technique d'analyse couplée à un détecteur TEA (analyseur à énergie thermique).

Le détecteur TEA est un détecteur spécifique aux nitrosamines basé sur le principe du clivage du lien N-NO et la détection du radical nitrosyl qui réagit avec l'ozone [Fine et al (1975)]. Le détecteur à énergie thermique est un détecteur qui est de moins en moins utilisé, puisque sa complexité le rend moins sensible que d'autres détecteurs qui sont disponibles maintenant.

Tableau 1.1 Conditions chromatographiques de la méthode NIOSH 2522 pour l'analyse des nitrosamines [NIOSH, 1994]

Conditions chromatographiques	
Technique	Chromatographie gazeuse avec détecteur TEA
Température du détecteur	500°C à 600°C
Volume d'injection	5 µL
Température d'injection	200°C
Colonne	10-pieds × 1/8-po diamètre. En acier inoxydable remplie avec 10% macrogol 20M avec 2% KOH dans 80/100 mesh de silice W-AW.
Température de la colonne	110°C à 200°C (programme à 5 min/ 18°C par min)
Désorption	2 mL 3:1 (v/v) dichloromethane/methanol
Échantillonneur	ThermoSorb/N™

1.6.3 Méthode OSHA 27

La méthode OSHA 27 [OSHA, 1985] dans le cas de l'analyse de nitrosamines est similaire à celle de NIOSH [NIOSH, 1994]. La technique chromatographique est la même avec un léger changement au niveau des conditions. Les résultats obtenus avec cette méthode ne sont pas loin de ceux obtenus avec la méthode NIOSH. Le désavantage principal est encore une fois le détecteur TEA qui est peu à peu remplacé par des détecteurs plus puissants et plus sensibles.

Tableau 1.2 Conditions chromatographiques de la méthode OSHA 27 pour l'analyse des nitrosamines [OSHA, 1985]

Conditions chromatographiques	
Technique	Chromatographie gazeuse avec détecteur TEA
Température de l'injecteur	150°C
Température de la colonne	150 à 200°C avec une température de chauffage de 4°C/min
Hélium (gaz porteur)	30 mL/min
Volume d'injection	5 µL
Colonne	10-pieds × 1/8-po diamètre. En acier inoxydable remplie avec 10% macrogol 20M avec 2% KOH dans 80/100 mesh de silice W-AW.
Oxygène	5 mL/min
Température de la trappe (froid)	-130°C
Échantillonneur	ThermoSorb/N™

1.6.4 Méthode HSE

Cette méthode utilise la chromatographie gazeuse couplée à un détecteur MS en mode SIM (Selected Ion Monitoring) [HSE, 2010]. À des concentrations supérieures à 1000 ng/mL, cette méthode ne donne plus de bons résultats due à une saturation évidente observée clairement sur le chromatogramme (forme des pics...). Cette méthode, malgré la grande sélectivité du détecteur MS, présente beaucoup d'interférences et plusieurs pics chromatographiques difficiles à identifier.

Tableau 1.3 Conditions chromatographiques de la méthode HSE pour l'analyse des nitrosamines [HSE, 2010]

Conditions chromatographiques	
Technique	Chromatographie gazeuse avec détecteur MS
Colonne	Série Hewlett Packard HP-5 (25 m × 0.32 mm × 1 µm)
Gaz vecteur	Helium
Débit de gaz	2 mL/min
Split Ratio	10:1
Température d'injecteur	250°C
Volume d'injection	5 µL
Gradient de température	Température initiale est de 50°C 50°C/min jusqu'à 100°C pendant 2 min 5°C/min jusqu'à 120°C pendant 0 min 20°C/min jusqu'à 200°C pendant 3.5 min
Échantillonneur	ThermoSorb/N™
Désorption	9 : 1 (v/v) dichlorométhane et méthanol

1.6.5 Méthode INRS

La méthode INRS [INRS, 2007] est basée sur les méthodes NIOSH et OSHA avec comme seule différence l'échantillonneur. L'INRS ont été les premiers à utiliser un tube séparant les deux produits contenus dans le tube ThermoSorb/N™, tel qu'expliqué précédemment. Ce tube a permis l'obtention d'une matrice plus propre, avec moins d'interférences, facilitant ainsi l'analyse et l'identification des pics.

Le désavantage de cette méthode réside, comme dans le cas des méthodes NIOSH et OSHA, dans le manque de stabilité du détecteur utilisé.

Tableau 1.4 Conditions chromatographiques de la méthode INRS pour l'analyse des nitrosamines [INRS, 2007]

Conditions chromatographiques	
Technique	Chromatographie gazeuse avec détecteur TEA
Colonne	Semi-capillaire, moyennement polaire. Type Chrompack CP Wax 52 CB, 20 à 30 m.
Température d'interface	270°C
Température du four	460°C
Débit d'O ₂ et du générateur d'ozone	8 mL/min
Température de refroidissement du photomultiplicateur	-14°C
Échantillonneur	Tube INRS
Solution de désorption	1,5 mL acétone

1.6.6 Méthode IRSST


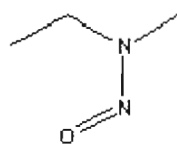
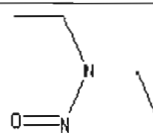
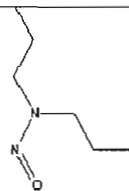
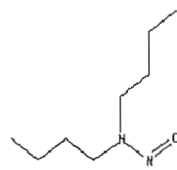
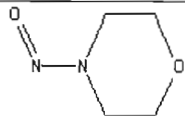
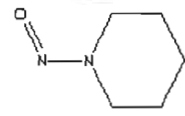
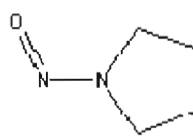
À l'IRSST (Institut de Recherche en Santé et Sécurité au Travail), un important développement a été effectué depuis 2007 afin de mettre une méthode d'analyse de nitrosamines dans l'air par chromatographie gazeuse avec détecteur azote phosphore (CG-DAP). Ce développement consiste en l'activité 99-561 et a toujours cours au Service et Expertise de Laboratoire (SEL) de L'IRSST.

Tableau 1.5 Conditions chromatographiques de la méthode IRSST pour l'analyse des nitrosamines (2007)

Conditions chromatographiques	
Technique	Chromatographie gazeuse avec détecteur DAP
Colonne	Stabilwax, 30 m, 0,32 mm ID, 1 µm df
Volume d'injection	2 µL
Split	Splitless
Gaz vecteur	Hélium
Four	Isotherme à 60°C pour 15 min, Gradient 5°C/min jusqu'à 230°C, isotherme à 230 pour 6 min.
Débit	2,8 mL/min, 13 min, 0,5 mL/min, 3,0 mL/min
Pression initiale	13 psi
Température d'injecteur	220°C
Température détecteur	300°C
Débit d'hydrogène	3,0 mL/min
Débit d'air	60 mL/min
Solution de désorption	acétone : dichlorométhane 98:2 (v/v)
Étalons internes	nitrosodiisopropylamine et quinoline

Dans cette méthode, comme dans les autres méthodes citées avant, les huit nitrosamines visées pour l'étude de l'IRSST (Tableau 1.6) ont été déterminées par NIOSH.

Tableau 1.6 Les huit nitrosamines déterminées par NIOSH

Nitrosamine	Formule moléculaire	Poids moléculaire	Classification par le CIRC	Structure chimique
Nitrosodiméthylamine (NDMA)	$C_2H_6N_2O$	74	2A	
Nitrosométhyléthylamine (NMEA)	$C_3H_7N_2O$	88	2B	
Nitrosodiéthylamine (NDEA)	$C_4H_{10}N_2O$	102	2A	
Nitrosodipropylamine (NDPA)	$C_6H_{14}N_2O$	130	2B	
Nitrosodibutylamine (NDBA)	$C_8H_{18}N_2O$	158	2B	
Nitrosomorpholine (NMOR)	$C_4H_8N_2O$	116	2B	
Nitrosopipéridine (NPIP)	$C_5H_{10}N_2O$	114	2B	
Nitrosopyrrolidine (NPYR)	$C_4H_8N_2O$	100	2B	

La méthode d'analyse par chromatographie gazeuse à détecteur Azote phosphore (CG-DNP) a été développée à l'IRSST au cours de l'activité 99-561 [IRSST, 2008]. Malgré que cette méthode réponde au besoin du réseau de la santé du travail, il reste que la technique instrumentale de dosage par CG-DNP, malgré sa sensibilité démontrée par les résultats obtenus (LQM = 40 ng / échantillon), présente la limitation majeure suivante: un manque de spécificité du mode de détection. En effet, le détecteur utilisé est un détecteur spécifique aux molécules organiques comportant des atomes de phosphore et/ou d'azote. Étant donné que l'industrie du caoutchouc, où l'évaluation des nitrosamines dans l'air est préconisée, produit une variété de composés organiques dont plusieurs contiennent de l'azote et/ou du phosphore qui sont détectables par le détecteur DAP, cela risque de produire des interférences chromatographiques. En raison de la complexité des procédés industriels mis en œuvre dans le domaine du caoutchouc, la prédiction des interférences chromatographiques potentielles est pratiquement impossible. Par conséquent, la méthode chromatographique CG-DAP ne peut, hors de tout doute, garantir une spécificité aux nitrosamines ciblées pour assurer une analyse fiable et exacte.

Le choix des techniques analytiques afin de séparer les nitrosamines dépend du type de nitrosamines à analyser. La chromatographie gazeuse (CG) peut-être utilisée autant que la chromatographie liquide (HPLC) pour l'analyse des nitrosamines [LGC, 2007].

1.7 Objectif du développement de la méthode actuelle

Afin de palier aux limitations de la méthode d'analyse par CG-DAP, un développement exploratoire a été fait au début de l'année 2008. Ce développement avait pour but d'explorer la possibilité d'utiliser la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) comme technique analytique afin d'analyser les huit nitrosamines identifiées par NIOSH. Lors de ce développement, la faisabilité du dosage de nitrosamines par CLHP-SM a été étudiée. Autrement dit, seule la capacité instrumentale a été testée, et ce sans aucun lien avec la matrice que l'on obtient avec la méthode développée sur CG-DAP. Ce développement a résulté en un rapport qui a indiqué que la technique CLHP-SM serait prometteuse pour l'analyse des 8 composés [Laliberté et

Aubin, 2008] dans les échantillons réels en milieux de travail.

Les objectifs de ce projet de développement visent à augmenter la sensibilité et la spécificité de la méthode déjà existante. La réalisation de ce projet permettra la validation d'une méthode analytique incluant l'échantillonnage et l'analyse. Les résultats permettront l'implantation d'une méthode d'analyse pour un ensemble de nitrosamines dans les laboratoires de l'IRSST.

L'autre objectif de cette étude est de développer une méthode de désorption compatible avec la méthode CLHP-MS. Dans la méthode actuelle, la désorption se fait dans 98% d'acétone et 2% de dichlorométhane. Cette méthode de désorption n'est pas compatible avec la méthode d'analyse en CLHP-SM, puisque l'utilisation de solutions ayant des proportions élevées d'acétone en CLHP n'est pas adéquate.

CHAPITRE II MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Échantillonnage

2.1.1 Réactifs

Les tubes d'échantillonnage contiennent respectivement de l'acide sulfamique 98% sous forme cristalline (H_3NSO_3) qui provient de Sigma-Aldrich (Cat# 86040, St-Louis, MO) et du Florisil® (MgSiO_3) qui provient de Fluka (Oakville, Ontario, Cat# 46384).

L'acide sulfamique doit être conservé au dessiccateur pour éviter l'humidité. La forme cristalline de ce dernier sert à diminuer le risque d'une trop grande restriction de l'échantillonneur au débit relativement élevé, recommandé par la méthode (2L/min).

2.1.2 Matériels d'échantillonnage

Liste de matériels utilisés :

- Tubes SPE vides en propylène non fluoreux de 0,5 mL (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, Cat# 57602-U).
- Tubes SPE vides en propylène non fluoreux de 1 mL (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, Cat# 57607-U).
- Bouchon mâles et femelles (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, Cat# 504351 et Cat# 57098).
- Treillis en acier inoxydable 200 mesh, disque de diamètre 8,5 mm pour le fond du tube (entrée d'air), (TWP inc., Berkeley, USA, Cat# 200X200S0021W48T).
- Treillis en acier inoxydable 200 mesh, disque de diamètre 9.1 mm pour le dessus du tube (sortie), (TWP inc., Berkeley, USA, Cat# 200X200S0021W48T).

2.1.2.1 Préparation des tubes INRS modifiés

La méthode a recours au même tube adsorbant que celui utilisé par l'INRS [INRS, 2007], auxquels des treillis en acier ont été rajoutés.

2.1.2.1.1 Pré-tube (Garde)

Un treillis métallique de 8,5 mm est déposé dans le fond d'un tube SPE vide de 0,5 mL. Environ 700 mg d'acide sulfamique sous forme cristalline sont transférés et déposés d'une façon uniforme dans ce tube. Un deuxième treillis métallique de 9,1 mm est déposé sur l'acide sulfamique. Le tube SPE est fermé en pressant le couvercle avec un presse tube.

Le pré-tube sert à capter les amines qui se trouvent dans l'air afin d'éviter qu'ils se transforment en nitrosamines dans le tube d'échantillonnage (Figure 1.1) et qui causent une surestimation lors des analyses de nitrosamines. Le contenu du pré-tube n'est pas à analyser.

Le débit relativement élevé (2 L/min) est réalisable grâce à la forme cristalline de l'acide sulfamique ne causant pas de restriction.

2.1.2.1.2 Tube adsorbant Florisil®

Le lavage du Florisil® avant utilisation : dans un bécher, selon le nombre d'échantillon voulu, mettre une quantité de Florisil®. Ajouter du méthanol jusqu'à couvrir le Florisil® et mettre sous agitation pendant 10 minutes. Le Florisil® est filtré sous-vide sur un entonnoir Büchner avec un filtre de 8 µm de porosité ensuite séché avec un flux d'azote. Remplissage : un treillis métallique de 8,5 mm est déposé dans le fond d'un tube SPE

vide de 1 mL. Environ 500 mg de Florisil® sont déposés d'une façon homogène dans le tube. Un deuxième treillis métallique de 9,1 mm est déposé sur le Florisil®. Le tube SPE est fermé en pressant le couvercle avec un presse tube. Le contenu de ce tube est analysé après désorption.

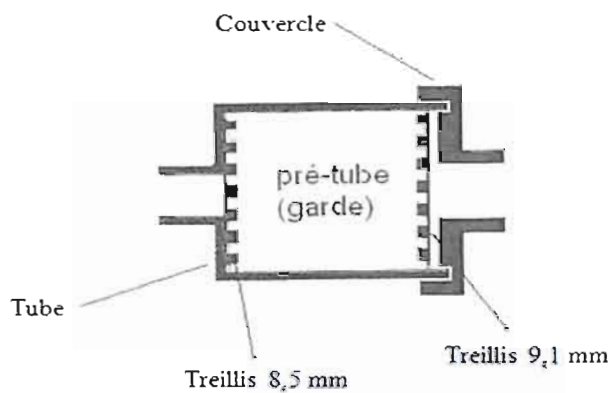


Figure 2.1 Schéma et description du pré-tube d'acide sulfamique

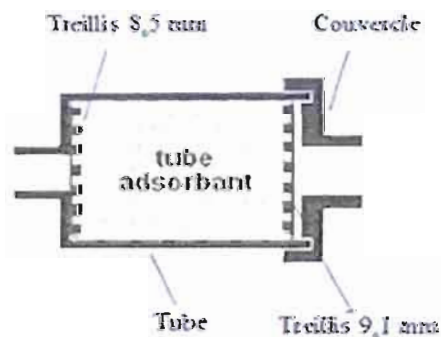


Figure 2.2 Schéma et description du tube adsorbant (Florisil®)

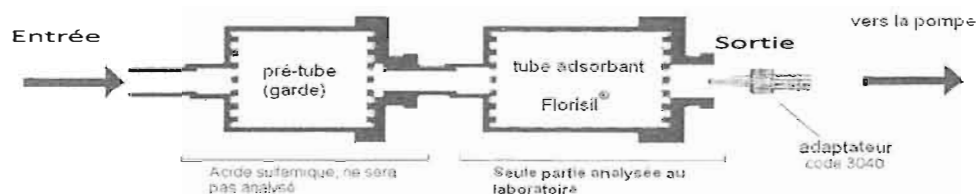


Figure 2.3 Schéma d'utilisation des tubes INRS modifié

2.1.2.2 Échantillonnage

Tableau 2.1 Matériel utilisé pour l'échantillonnage simulé et sur terrain

Échantillonnage simulé à l'IRSST			
	Appareils	Modèles	Provenance
Évaporation de nitrosamines	Chambre de verre		IRSST
Échantillonnage	Tube INRS modifié		
Autres appareils	Simple agitation	PA 16823-0048 USA	Supelco inc
	Presse tubes		IRSST
	Débitmètre	PN# 800268	Gilian instrument corp (USA)
	Pompes d'échantillonnage	CGK-27335	Gilian LFS-113 DC
		RGK-27379	Low Flow Sampler
		RGK-27380	
		RGK-27381	
		RGK-27382	
		RGK-27383	

2.1.2.2.1 Échantillonnage simulé à l'IRSST

Une quantité de nitrosamine a été évaporée (dans l'air) dans une chambre en verre fabriquée à l'IRSST [IRSST, 2008]. La chambre de verre contient trois sorties connectées chacune à des tubes en Y. Chacune des sorties Y est connectée à un tube d'échantillonnage (Figure 2.4).

La chambre de verre est pré-chauffée durant environ 2 heures afin d'atteindre une température de 30°C en utilisant une plaque chauffante. Une fois que la température de la chambre est à environ 30°C, un pétri contenant 1 mL d'une concentration C de nitrosamine dans la solution de désorption est déposé à l'intérieur. Six tubes d'échantillonnage sont connectés aux sorties de la chambre. Le pré-tube est lié directement à la chambre de génération tandis que les tubes d'échantillonnage sont reliés aux pompes (Figure 2.4).

Une petite ouverture est laissée lors de l'échantillonnage afin d'éviter de créer un vide à l'intérieur de la chambre. L'échantillonnage se fait à un débit de 0,1 L/min pendant 120 minutes, le volume d'échantillonnage est de 12 L.

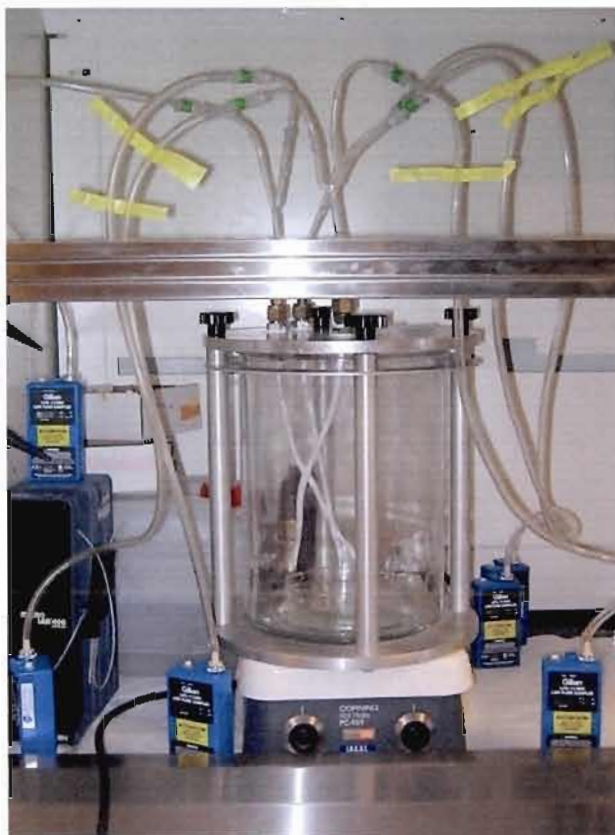


Figure 2.4 Système d'échantillonnage dans une chambre de génération de nitrosamines

2.2 Analyse

2.2.1 Réactifs

Les nitrosamines proviennent de Supelco : Nitrosamines Mix (2000 µg/mL, Cat# 48489), nitrosodiméthylamine (NDMA) (5000 µg/mL, Cat# 48552), nitrosadiéthylamine (NDEA) (5000 µg/mL, Cat# 442687), nitrosodipropylamine (NDPA) (5000 µg/mL, Cat# 48554), nitrosodibutylamine (NDBA) (5000 µg/mL, Cat# 442685), nitrosopipéridine (NPIP) (5000 µg/mL, Cat# 40458), nitrosopyrrolidine (NPYR) (100 µg/mL, Cat# 158240), nitrosomorpholine (NMOR) (5000µg/mL, Cat# 40485), nitrosométhyléthylamine (NMEA) (100 µg/mL, Cat# 861304). Le nitrosodipropyleamine-D₁₄ (99%) et le nitrosodiéthylamine-D₁₀ (99%), utilisés comme standards internes, proviennent quant à eux de CDN isotopes (Pointe-Claire, QC, Cat# D-2938 et D-2937).

Les solvants utilisés pour la désorption des nitrosamines, le dichlorométhane (DCM), le méthanol (MeOH) de pureté 99,8% et l'acétonitrile (ACN) de pureté 99,9%, proviennent de J.T.Baker (Phillipsburg, NY).

L'eau grade CLHP et le méthanol grade CLHP utilisés comme éluants proviennent de J.T. Baker (Phillipsburg, NY). L'acidification de la phase mobile à pH = 4 s'est faite avec de l'acide formique (96%) de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO).

2.2.2 Matériels

Filtre médium ($>8\ \mu\text{m}$) provenant de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO).

Seringue d'un volume de 10 mL avec filtre de ($0.22\ \mu\text{m}$) provenant de BD Luer-Lok™

Tip™ (Mississauga, ON, Cat# 309661).

Tableau 2.2 Liste des appareils utilisés pour l'analyse par CLHP/APCI-MS

Appareil		Modèle	Provenance
APCI-SM	Trappe ionique	Serie 1100	Agilent
CLHP	Dégazeur	G 1379 A	Agilent
	Pompe binaire	G 1312 A	
	Injecteur automatique	G 1313 A	
	Colonne (100 x 2.1 mm) et pré-colonne, $3.5\ \mu\text{m}$	Eclipse C18	
	Injecteur	Serie 6395 Harvard Apparatus 22	

CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Désorption des nitrosamines

3.1.1 Optimisation des paramètres de désorption

L'optimisation des paramètres de désorption avait pour objectif de mettre au point une méthode qui nous permettra de récupérer le maximum de nitrosamines adsorbées sur le Florisil®, à savoir le 100% de ce qui a été adsorbé. Pour cela, le choix du solvant était très important.

3.1.1.1 Solvant de désorption

La meilleure solution de désorption est une solution constituée des solvants utilisés comme éluant. Cela permettrait un meilleur équilibre du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile à chaque plateau théorique. Ainsi les traînées (le tailing) de pic sont minimisées [Timerbaev et *al.*, 1993]. Lors de l'injection des substances dans un solvant différent de l'éluant, généralement un solvant très polaire comme l'eau dans notre cas, des pics déformés sont obtenus parce que le solvant fort en question empêche un équilibre rapide entre la phase stationnaire et mobile [Timerbaev et *al.*, 1993]. Nous avons donc choisi, dans un premier temps, une solution de désorption eau/méthanol.

En gardant la même façon de désorber, que celle utilisée dans la méthode CG-DAP actuellement disponible à l'IRSST, plusieurs essais de désorption ont été effectués en changeant seulement l'acétone par un mélange d'eau / méthanol. Dans un premier temps, la proportion eau / méthanol à utiliser a été déterminée.

Il a été démontré que la forme des pics s'éloigne de plus en plus de la forme gaussienne à laquelle ils devraient ressembler. Le bruit de fond devient plus important et le signal de moins en moins haut avec l'augmentation de la proportion de méthanol dans la solution de désorption. Autrement dit, les pics sont larges et le facteur de traîne est grand.

À partir des résultats préliminaires obtenus avec l'essai de différentes proportions eau / méthanol, il a été conclu que le pourcentage de méthanol doit être minimisé au maximum afin d'obtenir la meilleure forme des pics et ainsi obtenir une meilleure résolution.

Un problème est survenu lorsque les analyses ont été poussées plus loin. Une poudre blanche est apparue dans la chambre d'ionisation après un certain nombre d'injection. Avec l'augmentation du nombre d'injection, la poudre blanche en question se retrouvait dans le capillaire, ce qui diminuait le signal d'une injection à l'autre et augmentait le bruit de fond. Le nettoyage du capillaire est devenu nécessaire à chaque analyse afin d'obtenir un bon signal. Le multiplicateur d'électron a dû être remplacé après ces testes..

Pour cette raison, il a été nécessaire de remettre en question plusieurs paramètres de la méthode déjà existante.

Plusieurs paramètres ont été suspectés:

1. Le Florisil® peut contenir des impuretés qui se retrouvent dans la solution de désorption après extraction ;
2. Le solvant de désorption : le Florisil® peut-être soluble dans le mélange $H_2O/MeOH$;
3. La sonication : le Florisil® peut se désintégrer lors de la sonication.

Mais la cause de l'apparition de cette poudre blanche n'a pas pu être déterminée avec exactitude, car plusieurs paramètres de désorption ont été changés en commençant par la solution de désorption.

Une solution de désorption utilisée selon la méthode NIOSH et OSHA a été testée dans notre laboratoire. Cette solution est constituée de 75% dichlorométhane et 25% méthanol et a donné d'excellents résultats.

Avec l'utilisation du mélange dichlorométhane / méthanol comme solution de désorption, il n'y avait plus de poudre blanche dans la chambre d'ionisation, même après cent injections successives. Le signal est resté stable tout au long de la séquence de cent injections.

Pour des raisons qui vont à l'encontre de la théorie et encore inconnues jusque là, la chromatographie obtenue avec le mélange dichlorométhane / méthanol comme solution de désorption est meilleure que celle obtenue avec une solution de désorption constituée d'un mélange eau / méthanol. Cela dit, un dédoublement de certains pics commence à être observé avec un volume d'injection élevé. Ces dédoublements de pics confirment bien que l'équilibre entre les deux phases (mobile et stationnaire) n'est pas atteint à cause de la différence entre l'éluant et la solution de désorption injectée. Cela a donc présenté une certaine limitation quant au volume d'injection utilisé et donc l'abondance des pics. L'évaporation pour concentrer l'échantillon n'est pas possible car les nitrosamines analysées sont volatiles et peuvent être perdues durant cette étape.

3.1.1.2 Optimisation de la méthode d'extraction

Après les différents tests, la sonication cause la production de la poudre blanche trouvée dans la chambre d'ionisation pour cela cette méthode d'extraction a été écartée et n'a pas été étudiée.

Les trois méthodes suivantes ont été testées. Pour ce faire, un volume connu (selon la quantité voulue) d'un mélange des huit nitrosamines est ajouté à environs 500 mg de Florisil® contenu dans des tubes d'échantillonnage. Neuf tubes d'échantillonnage ont été dopés de cette façon. Un volume de 1,5 mL de la solution de désorption est ajouté au Florisil® transféré, après le dopage du florisil avec une concentration de 1 µg/mL d'un mélange de nitrosamine (1,5 µg). La méthode d'extraction pour chacune des trois fioles était différente.

L'extraction s'est effectuée comme suit (en triplicata pour chaque méthode):

- Trois fioles ont été laissées au repos pour 30 minutes ;
- Trois fioles ont été mises sur un vibreur pendant 30 minutes ;
- Trois fioles ont été mises sur un agitateur pendant 30 minutes à 150 tr/min.

Le tableau 3.1 ci-dessous résume les concentrations utilisées et celles récupérées avec les différentes méthodes d'extraction testées.

Tableau 3.1 Quantités initiales et récupérées pour chaque méthode utilisée

	NDMA	NMOR	NPYR	NMEA	NDEA	NPIP	NDPA	NDBA
Fioles laissées au repos pendant 30 minutes								
Quantité initiale (µg)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Quantité récupérée (µg)	0,07	0,41	0,43	0,32	0,43	0,38	0,32	0,30
Écart-type	0,01	0,08	0,06	0,07	0,03	0,05	0,05	0,05
fioles ont été mises sur un vibreur pendant 30 minutes								
Quantité initiale (µg)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Quantité récupérée (µg)	1,39	1,36	1,4	1,02	1,39	1,3	1,22	1,22
Écart-type	0,02	0,38	0,11	0,07	0,03	0,05	0,02	0,03
fioles ont été mises sur un agitateur pendant 30 minutes								
Quantité initiale (µg)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Quantité récupérée (µg)	1,24	1,19	1,33	1,02	1,23	1,18	1,02	1,17
Écart-type	0,02	0,02	0,02	0,15	0,06	0,03	0,07	0,04

Les taux d'extraction obtenus par ces trois méthodes d'extraction sont présentés par la Figure 3.1 ci-dessous.

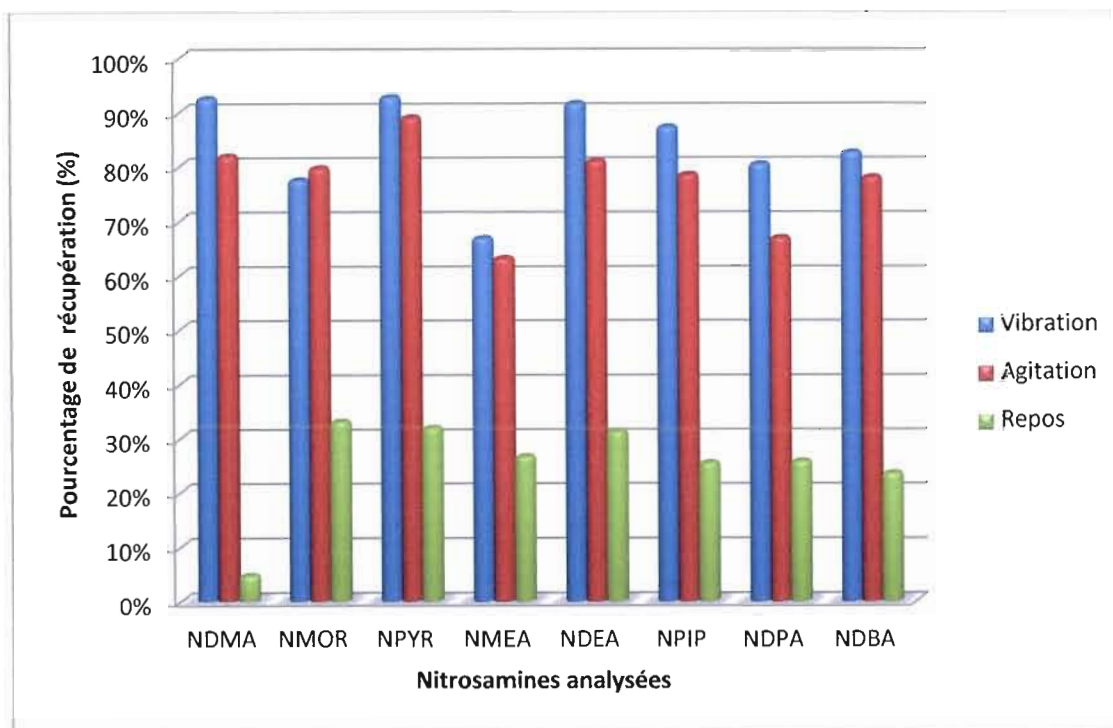


Figure 3.1 Comparaison des méthodes de désorption pour les huit nitrosamines

Les écarts-type obtenus pour chaque méthode testée démontrent une reproductibilité des méthodes d'extraction et d'analyse. Il est clair, des résultats obtenus, que l'extraction par vibration est celle qui permet une meilleure récupération avec des taux de récupération, pour la plupart des nitrosamines, supérieurs à 70%. À partir des taux de récupération obtenus, il a été conclu que la désorption se fera par vibration. Afin de minimiser les chances de retrouver de la poudre blanche dans la chambre d'ionisation, les solutions seront laissées au repos pendant 30 minutes, après la désorption par vibration, pour bien décanter.

Cela contribuera à éliminer toutes les suspensions qui se retrouveront dans le fond de la fiole et évite la surcharge du filtre lors de l'étape suivante. Le surnageant pipeté est filtré avec des filtres de 0,22 μm avant d'être transféré pour l'analyse.

3.1.1.3 Choix de l'étalon interne

Un étalon interne bien choisi peut compenser certaines erreurs aléatoires et systématiques. En effet, si les signaux de l'analyte et de l'étalon interne sont tous deux proportionnels aux variations de la méthode, le rapport des deux signaux sera indépendant des fluctuations [Skoog et *al.* 2003].

Le dosage par étalonnage interne est basé sur le principe de rajouter une quantité connue d'une substance, qui sert de référence durant les étapes de préparation d'échantillon et l'analyse, dans tous les échantillons et solutions étalons.

Le dosage, plutôt que d'être fait de façon absolue à partir d'une droite d'étalonnage de l'analyte cible (étalonnage externe), se fait de façon relative par rapport à cette substance de référence, appelée étalon interne [Mesplède et Randon, 2004].

L'étalon interne doit présenter les propriétés suivantes :

- Ne pas se trouver dans l'échantillon;
- Être distinguable des analytes cibles;
- Avoir des propriétés physiques et chimiques proches des composés à analyser.

Lors de l'analyse, les éventuelles variations de signaux (instrumentales, erreurs de prises de solution d'analyse, dilutions, etc...) dans la détection des analytes sont également observées pour les étalons internes, puisque ces composés se comportent de façon

similaire. En travaillant avec le rapport des deux signaux (analyte et étalon interne), il est alors possible de s'affranchir de ces variations.

Dans le cadre de ce projet, deux étalons internes ont été choisis pour l'étalonnage afin de minimiser le plus possible les erreurs.

Étant donné que plusieurs nitrosamines peuvent être retrouvées dans l'industrie ciblée par notre développement, des composés deutérés sont utilisés comme étalons internes afin d'éviter toute éventuelle interférence et surestimation de standard interne.

Les composés deutérés de nitrosamines choisis sont la nitrosodipropylamine-D₁₄ (NDPA-D₁₄) et la nitrosodiéthylamine-D₁₀ (NDEA-D₁₀). Ces deux composés ont des propriétés chimiques identiques des nitrosamines à analyser, ne risquent pas de se retrouver dans le milieu d'échantillonnage et sont disponibles commercialement.

3.1.2 Méthode de désorption mise au point

La solution de désorption est un mélange de 75% (v/v) dichlorométhane et 25% (v/v) méthanol contenant 200 ng/mL de standards internes (nitrosodipropyleamine-D₁₄ et nitrosodiéthylamine-D₁₀).

Étape de la désorption des nitrosamines

- Le Florisil® qui a servi à capter les nitrosamines échantillonnées est transféré dans une fiole ;
- 1.5 mL de la solution de désorption est rajoutée au Florisil® ;
- Les fioles sont déposées sur un vibreur pendant 30 minutes ;
- La solution est ensuite laissée au repos pour 30 minutes de plus ;
- Le surnageant est prélevé avec une seringue (environ 0,8mL);

- Le surnageant est filtré sur du 0.22 μm et transféré dans des fioles ;
- L'analyse se fait par CLHP/SM en injectant 6 μL de surnageant filtré.

3.1.3 Méthode d'analyse

Les analyses sont effectuées par CLHP/APCI-MS sur une trappe ionique couplée à un chromatographe liquide à haute performance avec une interface d'ionisation par ionisation chimique à pression atmosphérique, tous de la série 1100 d'Agilent Technologies.

3.1.3.1 *Optimisation des paramètres d'CLHP*

Deux principaux paramètres ont été visés pour l'optimisation de la méthode :

En général, la forme des pics chromatographique s'approche d'une forme gaussienne qui peut ressembler à la figure 3.2 et qui peut être décrite par les équations 1 et 2 à la page suivante :

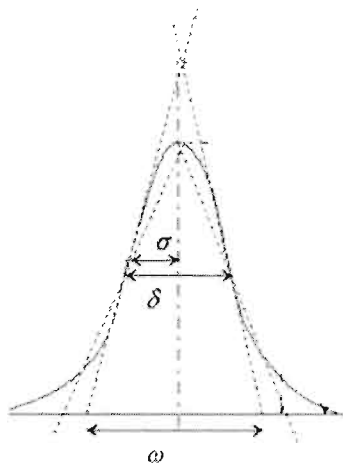


Figure 3.2 Forme théorique d'un pic chromatographique [Meyer, 2004]

avec :

σ : écart type : distance entre le point d'inflexion (point où la dérivée seconde s'annule) et la moitié de la courbe ; δ : largeur du pic à mi-hauteur ; ω : largeur à la base (unité de temps).

Cela étant dit, cette forme n'existe que dans des conditions idéales. En réalité, la forme des pics chromatographies est une forme gaussienne modifiée par une courbe de décroissance exponentielle (la gaussienne modifiée exponentiellement, GME).

La GME est caractérisée par son facteur d'asymétrie, A_s , et par le facteur de traîne TF (peak tailing factor). Si le facteur d'asymétrie est supérieur à 1,5, le pic n'est pas symétrique et cela peut nuire lors de la quantification. Autrement dit, cela peut affecter la sensibilité de la méthode.

La fonction d'asymétrie est calculé par :

$$A_s = A/B, \quad (\text{équation 1})$$

où **A** est la première moitié du pic et **B** la deuxième moitié du pic mesurés à 10% de la hauteur du pic même [Jeansonne et Foley, 1991].

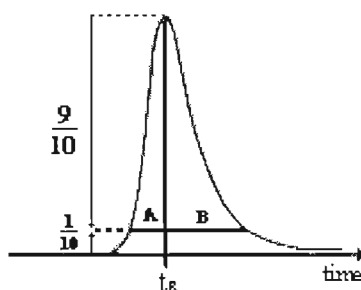


Figure 3.3 Exemple de figure pour le calcul du facteur de traîne

Le facteur de traîne quant à lui est représenté par l'équation suivante :

$$TF = (A' + B') / 2A', \quad (\text{équation 2})$$

où A' est la première moitié du pic et B' et la deuxième moitié du pic mesurés à 5% de la hauteur du pic même [Jeansonne et Foley, 1991].

Plusieurs paramètres peuvent affecter la forme et conduisent à une traînée des pics par exemple : le solvant d'élution, le débit, le volume d'injection, température de colonne, etc.

Deux paramètres ont été visés afin de mettre au point une méthode d'analyse efficace à savoir :

1) Sensibilité de la méthode :

Comme il a déjà été mentionné dans l'introduction, les concentrations des nitrosamines à analyser sont très faibles. Les normes recommandées pour les nitrosamines nous incitent à chercher dans notre développement le maximum de sensibilité.

2) Sélectivité de la méthode :

Cette caractéristique est étudiée en premier. En effet, elle permet de vérifier que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché.

2) Sélectivité de la méthode :

Cette caractéristique est étudiée en premier. En effet, elle permet de vérifier que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché.

La sélectivité peut se définir comme la capacité de la méthode d'analyse (appareil de mesure...) à discerner un analyte donné dans un mélange complexe.

3.1.3.1.1 Optimisation des paramètres de chromatographie

3.1.3.1.1.1 *Choix de la colonne chromatographique*

Vu la polarité des composés à analyser, nous avons opté pour une chromatographie en polarité de phase inversée. Cette technique permet la séparation des composés en fonction de leurs interactions avec une phase stationnaire non-polaire (groupement octadécylsilanes C18 greffés sur un support de silice en majorité du temps) et une phase mobile polaire (en général, mélange de solvants eau-méthanol ou eau-acétonitrile). Les composés les plus polaires, les moins retenus par la phase stationnaire, élueront en premier, tandis que les composés les moins polaires seront plus retenus et élueront en dernier.

Notre choix pour la phase stationnaire s'est arrêté à des colonnes greffées C18. Ces colonnes sont constituées de greffons à longues chaînes linéaires de 18 carbones. Elles sont résistantes avec une longue durée de vie. Environ 80% des séparations en CLHP utilisent cette phase stationnaire. L'action de cette phase stationnaire se limite à offrir une surface d'accueil non polaire aux solutés. Plus cette surface est grande, plus le soluté sera associé longtemps avec la phase et meilleure est la séparation.

Tableau 3.2 Les colonnes qui ont été testées lors de ce développement

Colonne	Type	Diamètre et Longueur de la colonne	Diamètre des particules	Compagnie
Luna®	C18	2,0 x 150 mm	3 µm	Phenomenex
Extend- Zorbax®	C18	2,1 x 150 mm	3,5 µm	Agilent
Bonus-Zorbax ®	C18	2,1 x 150 mm	2,6 µm	Agilent
Eclipse-Zorbax ®	C18	2,1 x 100 mm	3,5 µm	Agilent

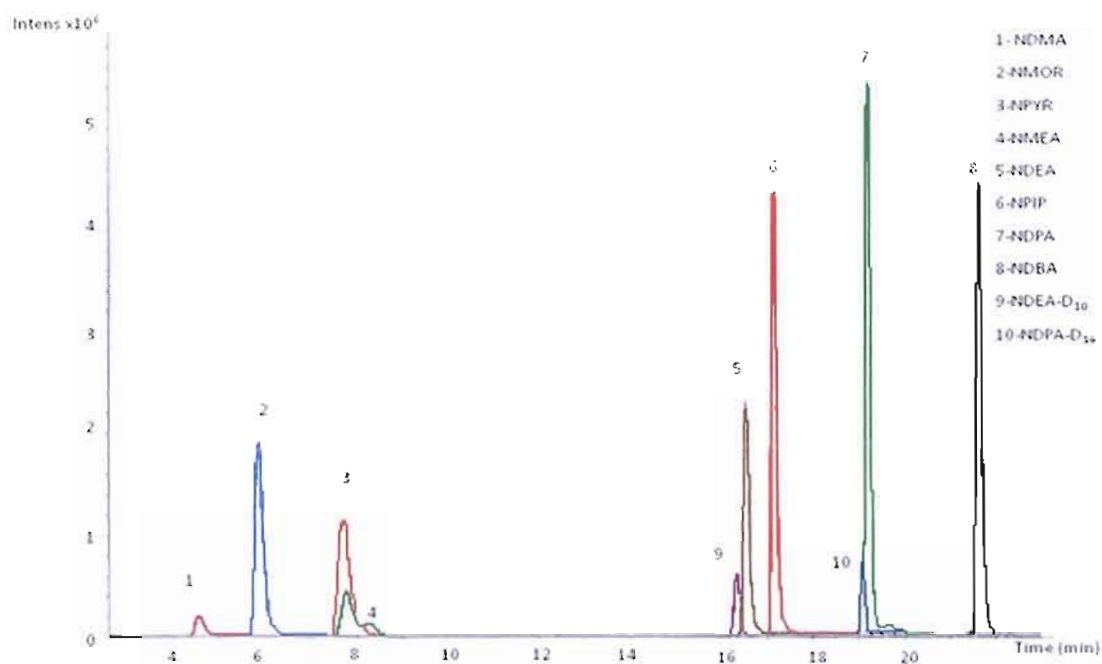
Avec :

1. Extend-Zorbax®: matériaux de remplissage est octadécylsilane greffé chimiquement a des microparticules de céramique ou de silice poreuse de 1,5 a 10 µm, taille des pores 80 Å.
2. Bonus-Zorbax®: matériaux de remplissage particule de gel de silice poreux sphérique de granulométrie de 10 µm ou moins dont la surface a été greffée par des liaisons covalente avec des groupements alkyl-amide avec postsilanisation.
3. Eclipse-Zorbax®: matériaux de remplissage est octadécylsilane greffé chimiquement a des microparticules de céramique ou de silice poreuse de 1,5 a 10 µm, taille des pores 95 Å.

Le développement de cette méthode a été initié en utilisant une colonne Luna C18 de Phenomenex (Tableau 3.2). Cette colonne a été testée pour sa disponibilité au laboratoire lors du développement exploratoire de la méthode LC/MS [Laliberté et Aubin, 2008] et le résultat est montré par la figure 3.4. Les résultats présentés ont été obtenus en changeant seulement la colonne, les autres paramètres chromatographiques sont ceux qui ont donnés les meilleurs résultats, à cette étape du développement, pour la colonne Eclipse®-Zorbax (retenu pour le protocole d'analyse final).

Tableau 3.3 Conditions chromatographiques utilisées lors du choix de la colonne

Paramètre chromatographiques	Conditions		
Éluants	Eau/ MeOH		
Gradient d'élution	Temps (min)	Eau(%)	MeOH(%)
	0	5	95
	8	5	95
	9	70	30
	25	70	30
	25,5	5	95
	30	5	95
Volume d'injection	6 μ L		
Débit	0,4 ml/min		

**Figure 3.4** Chromatogramme obtenu avec la colonne Luna® pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 μ g/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3)

La même colonne (Luna C18) a été reprise lors du début du développement de cette méthode en utilisant des paramètres LC et MS modifiés. D'une part, il n'y a pas de séparation entre les deux pics de nitrosométhyléthylamine et de nitrosomorpholine avec cette colonne (Figure 3.4), même avec des conditions de phase mobile très polaire au début de gradient (95% d'eau). D'autre part, la forme des pics se dégrade d'une injection à l'autre. Un autre inconvénient de cette colonne est que la pression à un débit de 0,4 ml/min, qui permet un bon temps d'analyse et une bonne séparation des pics avec une autre colonne, est trop élevée.

Les pics obtenus avec la colonne Extend®-ZorbaxC18 de Agilent présentent des pics larges (Figure 3.5). La forme des pics obtenus, particulièrement les quatre premiers, ne nous permet pas d'intégrer les pics correctement, ce qui diminue la précision de la quantification de nos composés et par conséquent de la sensibilité de la méthode. Nous pouvons également constater la mauvaise résolution entre le nitrosomorpholine et le nitrosométhyléthylamine qui sortent presque au même moment.

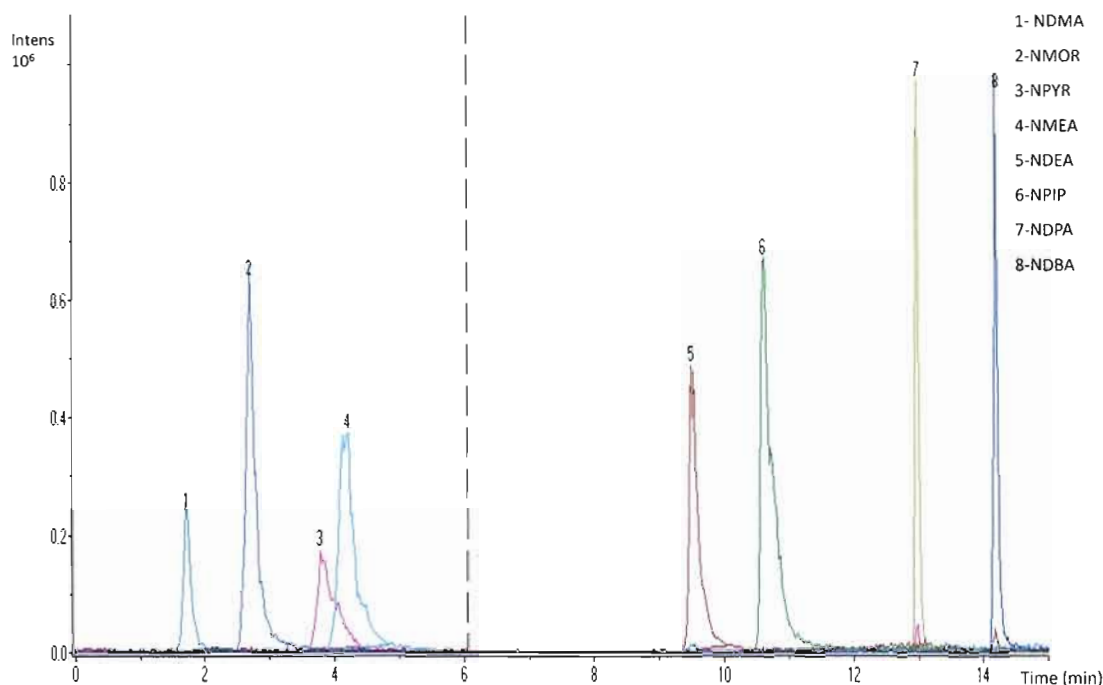


Figure 3.5 Chromatogramme obtenu avec la colonne Extend-Zorbax® pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3)

Puisque la séparation des quatre premiers pics de notre chromatogramme se fait mieux à un gradient débutant par une phase mobile très polaire, le fait de commencer avec un gradient à 100 % eau semblait une bonne méthode pour bien séparer ces composés. Étant donné que la colonne Bonus® est faite de façon à supporter jusqu'à 100% eau, elle a été choisie à titre d'essai.

La séparation obtenue avec la colonne Bonus®-Zorbax était loin de nos attentes (Figure 3.6), puisque les pics obtenus avec cette colonne sont très larges et complètement déformés. La traînée des pics menait à une mauvaise résolution puisque les pics se chevauchaient. Il a aussi été constaté que la forme des pics se dégradait d'une injection à l'autre. Autrement dit, la colonne ne présentait aucune reproductibilité et s'est avérée inappropriée.

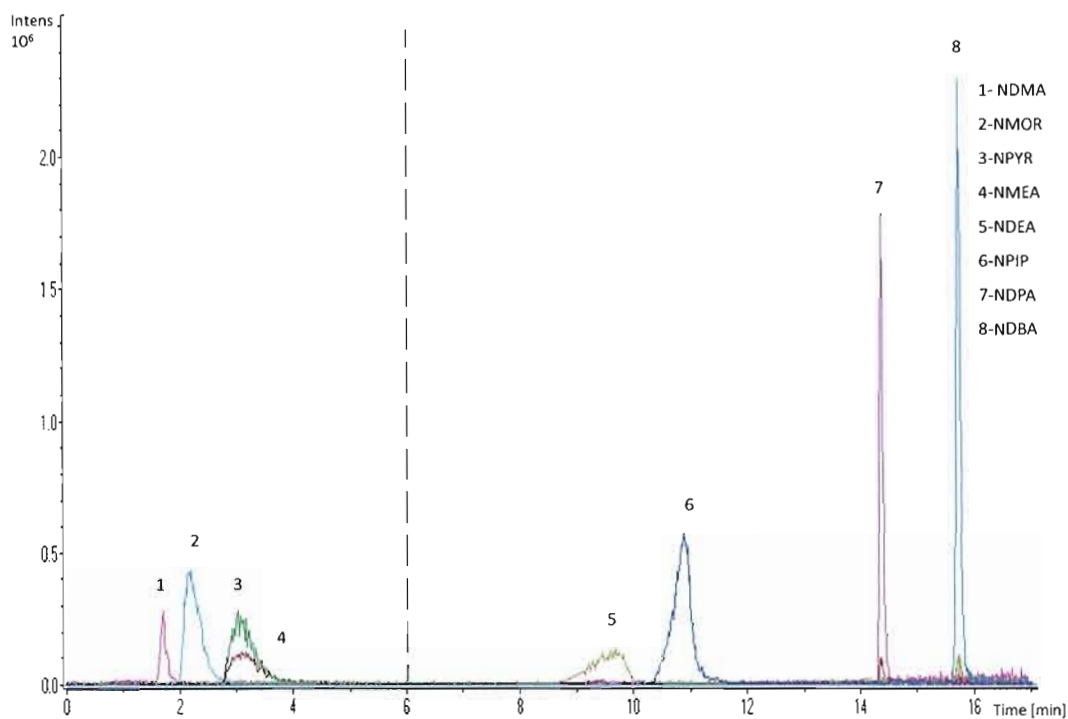


Figure 3.6 Chromatogramme obtenu avec la colonne Bonus®-Zorbax pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3)

Par ailleurs, la colonne Eclipse, d'une longueur de 100 mm, a permis une bonne résolution ainsi qu'un court temps d'analyse, comme le montre le chromatogramme (Figure 3.7) suivant.

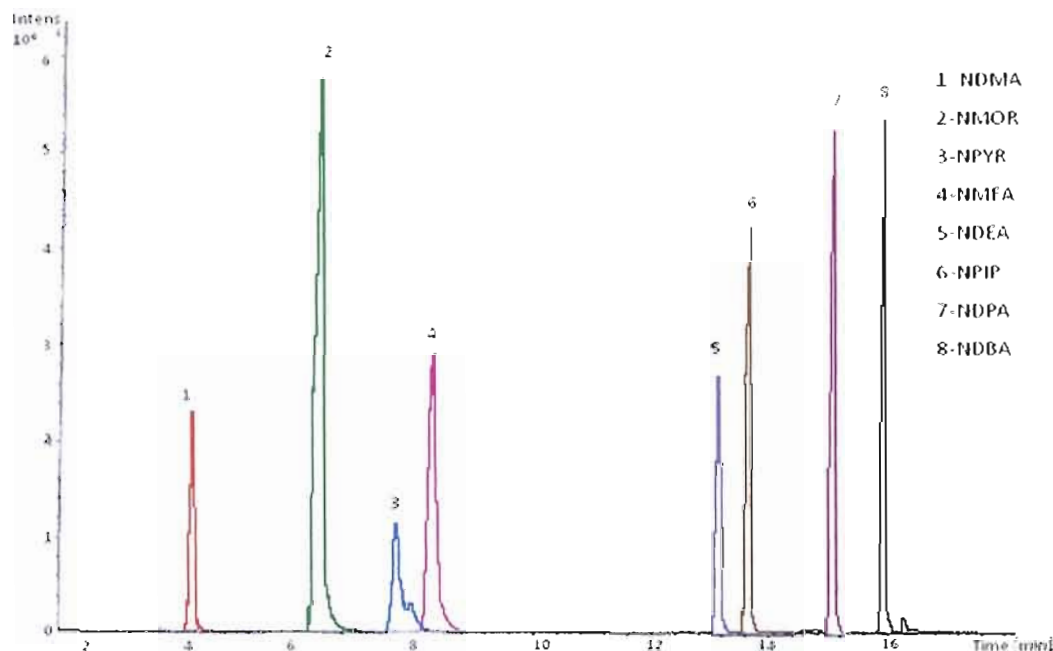


Figure 3.7 Chromatogramme obtenu avec la colonne Eclipse®-Zorbax pour un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 µg/mL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3)

En comparant les chromatogrammes obtenus avec les quatre colonnes testées, la colonne Eclipse®Zorbax d'Agilent est celle qui a permis une meilleure chromatographie. Ainsi celle-ci a été choisie pour poursuivre le développement de la méthode d'analyse.

3.1.3.1.1.2 Choix du solvant d'élution

Les interactions avec l'éluant prédominent en chromatographie de partage à polarité de phase inversée, où la phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile. Les solvants généralement utilisés sont des mélanges eau-acétonitrile ou eau-méthanol, puisque ce sont des solvants polaires qui interagissent facilement avec les composés polaires analysés avec ce genre de chromatographie.

Les deux mélanges de solvant (eau-acétonitrile et eau méthanol) ont été testés et les résultats sont présentés aux figures 3.8 et 3.9.

Solvant d'élution eau-acétonitrile :

Le mélange eau-acétonitrile, a nécessité un changement dans le gradient d'élution pour obtenir une séparation adéquate.

Tableau 3.4 Conditions chromatographiques utilisés lors du choix du solvant d'élution

Paramètre chromatographiques	Conditions		
Colonne	Eclipse-Zorbax ® C18 (2,1 x 100 mm), 3,5 µm, Agilent		
Gradient d'élution	Temps (min)	Eau(%)	ACN(%)
	0	5	95
	10	5	95
	20	70	30
	35	70	30
	35,5	5	95
	45	5	95
Volume d'injection	6 µL		
Débit	0,4 ml/min		

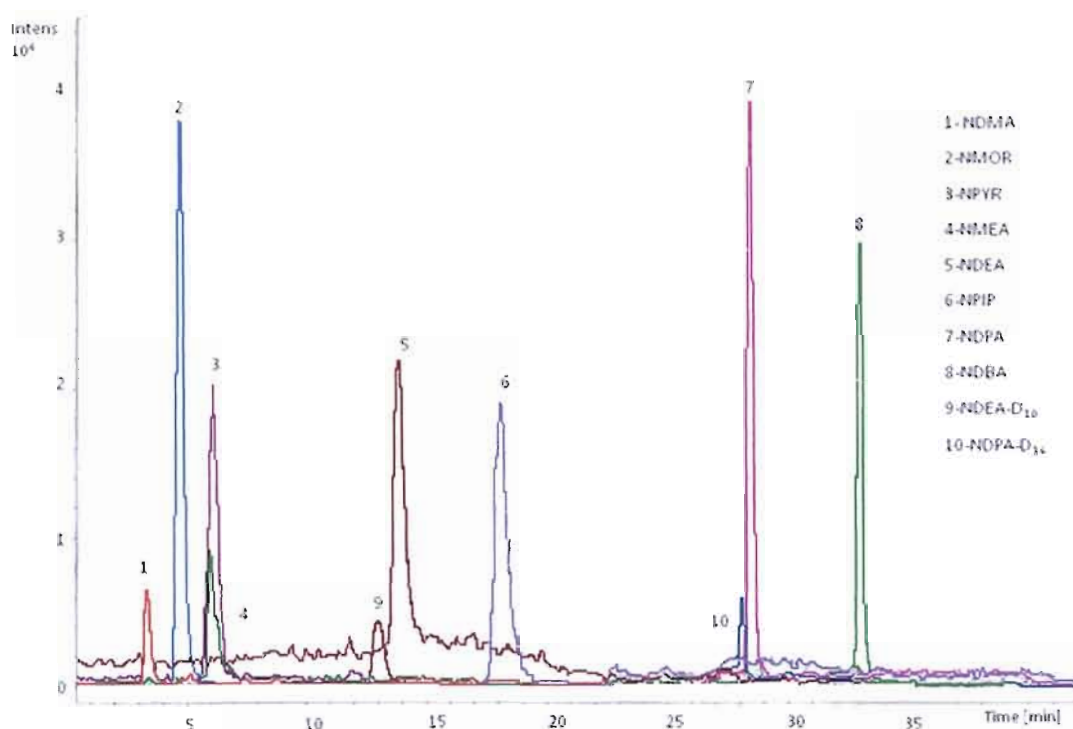


Figure 3.8 Chromatogramme obtenu avec eau-acétonitrile comme phase mobile pour un mélange des huit nitrosamines de 1 µg/mL (Conditions chromatographique Tableau 3.4)

Le bruit de fond obtenu en utilisant le mélange eau-acétonitrile est trop élevé au point de couvrir certains pics. D'autres composés plus abondants sont difficilement intégrables ce qui peut provoquer des erreurs de quantification et ainsi diminuer la sensibilité et la fiabilité de la méthode. Une quantification par la hauteur des pics ne peut être utilisée non plus puisque la forme de certains pics n'est pas symétrique.

Solvant d'élution eau-méthanol :

Tableau 3.5 Conditions chromatographiques utilisés lors du choix du solvant d'élution

Paramètre chromatographiques	Conditions		
Colonne	Eclipse-Zorbax ® C18 (2,1 x 100 mm), 3,5 µm, Agilent		
Gradient d'élution	Temps (min)	Eau(%)	MeOH(%)
	0	5	95
	8	5	95
	9	70	30
	25	70	30
	25,5	5	95
	30	5	95
Volume d'injection	6 µL		

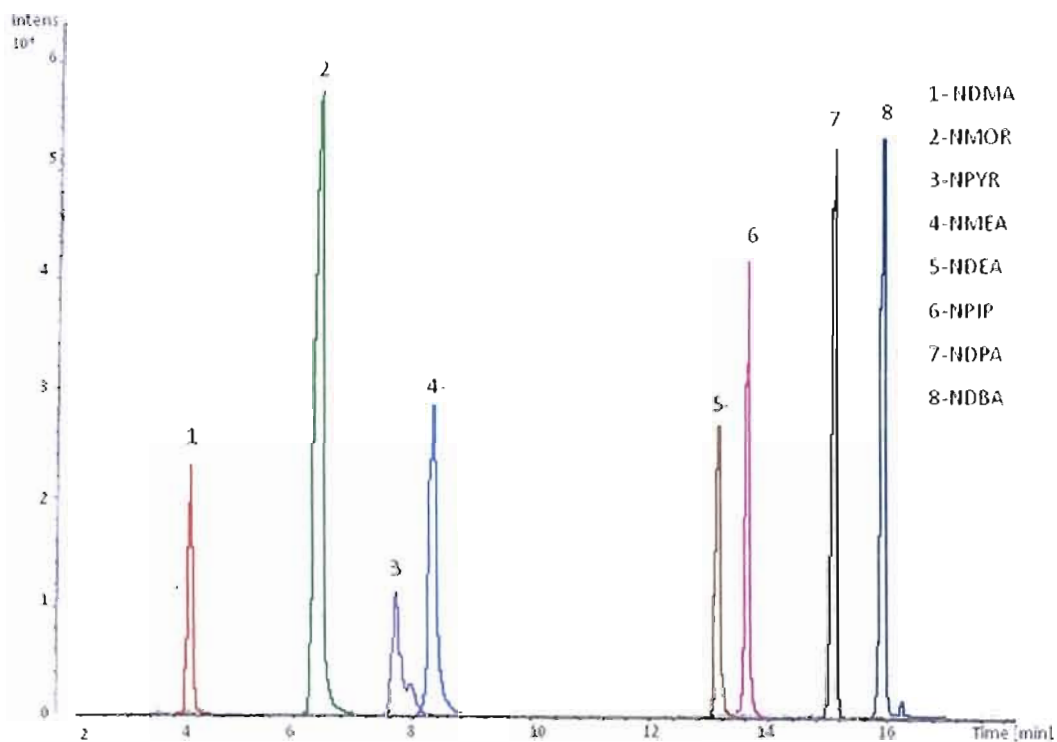


Figure 3.9 Chromatogramme obtenu avec Eau/Méthanol comme éluant pour un mélange des huit nitrosamines de 1 µg/mL (Conditions chromatographique Tableau 3.5)

Le temps d'analyse est beaucoup plus lent avec l'éluant eau-acétonitrile. Cela est dû à un ajustement de gradient afin d'essayer de mieux séparer les composés. Avec le mélange eau-acétonitrile, il a été observé qu'une meilleure séparation est obtenue lors d'une augmentation graduelle et lente de la proportion d'acétonitrile.

Avec un mélange eau-méthanol comme éluant, la chromatographie obtenue est meilleure. Le bruit de fond n'est pas élevé et la séparation, particulièrement des quatre premiers composés, est meilleure. Suite à ces résultats notre choix de solvant d'élution a été eau-méthanol. Le pH de la phase mobile a été ajusté à $\text{pH} = 4,0 \pm 0,5$ avec de l'acide formique (app 1% v/v) afin de minimiser la traînée des pics.

3.1.3.1.1.3 Choix du gradient d'élution

Un gradient optimal vise :

- Une bonne séparation des pics ;
- Un temps d'analyse relativement court ;
- Une bonne stabilisation de la phase stationnaire et la garder le plus longtemps possible.

Afin de respecter ces critères, plusieurs gradients ont été testés. Notre choix de composition d'éluant pour le début d'élution a été limité par le fait que nos premiers composés ne sont séparés seulement si le pourcentage de méthanol est faible. Il a été démontré qu'avec un gradient qui commence avec une proportion de méthanol supérieur à 5% par rapport à celle de l'eau, il n'y a pratiquement aucune séparation des premiers composés.

D'un autre coté, un 100 % eau permet une totale séparation des composés à analyser. Cependant, c'est une condition chromatographique qui n'est pas idéale pour la phase stationnaire et qui risque de la détruire plus rapidement.

Des tests à un pourcentage de méthanol plus bas que 5% ont démontré une variation des résultats d'une injection à une autre. Cette variation a été attribuée à un déséquilibre de la phase stationnaire quand celle-ci est en contact avec une grande proportion d'eau (plus de 95 % eau). Cette situation a amené à prolonger le temps d'arrêt de l'analyse de 9 minutes afin de permettre une meilleure rééquilibration de la phase stationnaire entre chaque injection, ce qui a permis une meilleure reproductibilité.

Le meilleur compromis a été de débiter le gradient par un mélange 5% de méthanol et 95% d'eau.

Puisqu'il n'y a eu aucun problème de résolution à prendre en considération pour les quatre dernières nitrosamines, le seul critère qui a guidé notre choix était le temps total de l'analyse. Afin de raccourcir ce temps, un grand pourcentage de méthanol est requis. Le passage d'un bas pourcentage à un très grand pourcentage de méthanol en quelques minutes aurait pu causer des dommages dans la phase stationnaire. Pour cela, un palier de 20% méthanol a été mis pour quelques minutes afin de donner le temps à la phase stationnaire de s'équilibrer.

3.1.3.1.1.4 Choix du volume d'injection

Un grand volume d'injection aurait été le choix idéal afin d'avoir la plus grande abondance et donc augmenter la sensibilité de notre méthode.

Plusieurs volumes d'injection ont été testés en commençant par un volume de 10 μL . Comme observé sur le chromatogramme (Figure 3.10), les pics du nitrosométhylethylamine (NMEA) et du nitrosopipiridine (NPIP) sont dédoublés et larges. Cela empêche la bonne intégration de ces pics et ainsi une bonne quantification de ces composés. Ce phénomène de dédoublement est dû à une saturation de la colonne lors de l'injection ainsi qu'à la lenteur de l'équilibre du soluté entre la phase mobile et stationnaire, puisque nos solvants d'élution et de désorption sont différents comme expliqué précédemment.

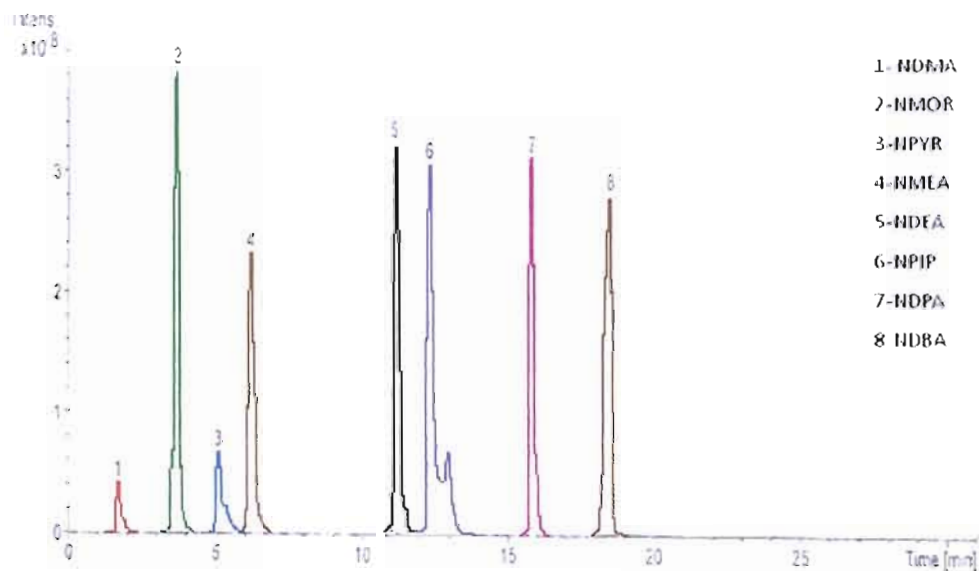


Figure 3.10 Chromatogramme obtenu avec un volume d'injection de 10 μL (Conditions chromatographiques Tableau 3.3)

Il a été démontré que le dédoublement de ces deux pics s'estompe avec la diminution du volume d'injection. Un volume d'injection de 6 μL a été choisi puisque les tests ont démontré que c'est un volume qui permet un compromis entre une abondance des pics et une bonne forme des pics.

3.1.3.1.1.5 Choix du débit d'élution

Notre choix de débit d'élution a été limité par le fait que notre détecteur est un spectromètre de masse et que le débit ne peut être plus élevé que 0,5 mL/min.

Un débit de 0,4 mL/min a été choisi parce que cela a permis de réduire le facteur de traîné des pics et de diminuer le temps total d'analyse tout en gardant une bonne résolution entre les pics.

3.1.3.1.1.6 Choix de la température de la colonne

L'augmentation de la température de la colonne à 35 °C a permis d'augmenter le signal de certains pics et en particulier, de doubler l'abondance du nitrosodiméthylamine (NDMA) qui était le pic le moins abondant et le plus difficile à détecter alors qu'il est le plus toxique d'entre les huit nitrosamines analysées.

La durée de vie de la colonne diminue significativement à une température plus élevée que 40 °C [Agilent Technologies, 2009]. Pour cette raison, la température de 35 °C est celle qui a permis un compromis entre importance du signal et stabilité de la colonne.

Un résumé des paramètres optimaux pour l'analyse par CLHP est présenté au tableau 3.6

Tableau 3.6 Paramètres optimaux pour l'analyse par CLHP des nitrosamines

CLHP			
Colonne			
Colonne de garde	Eclipse®-Zorbax d'gilent cartouche de garde (4,6 x12,5 mm)		
Type de colonne analytique	Eclipse®-Zorbax d'Agilent C18 (2,1 x 100 mm, 3,5µm)		
Conditions LC			
Température de la colonne	35 °C		
Phase mobile	Eau/MeOH à pH = 4,0 ± 0,5		
Débit	0,4 mL/min		
Volume d'injection	6 µL		
Gradient	Temps (min)	MeOH(%)	Eau(%)
	0	5	95
	4	5	95
	7	20	80
	10	75	25
	15	75	25
	17	20	80
	21	5	95
	30	5	95

3.1.3.2 Optimisation des paramètres MS

3.1.3.2.1 Choix de la source d'ionisation

Lors du développement exploratoire de la méthode [Laliberté et Aubin, 2008], les sources d'ionisation ESI (Electrospray Ionization) et APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) ont été examinées en mode d'ionisation positif.

Lors de l'ionisation par la source ESI, le soluté est transformé en un nuage de gouttelettes chargées sous l'effet d'un champ électrique intense. Un courant d'azote chaud l'aide à faire évaporer les gouttelettes qui se transforment en microgouttelettes sous l'effet d'une grande densité de charge. Durant le parcours des ions formés, ils subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz, ce qui complète leur désolvatation.

Tandis que la source d'ionisation APCI (Figure 3.11) fait appel à des réactions ions-molécules en phase gazeuse où la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz d'ionisation, le liquide est introduit dans un nébuliseur pneumatique, où il est transformé en fin brouillard. La désolvatation est effectuée grâce à un chauffage et les particules sont ionisées chimiquement à pression atmosphérique.

Lors de la première étape de développement effectuée, l'analyse des masses sur charge produites a été réalisée à l'aide d'une trappe ionique en mode de balayage répétitif. La vérification des deux sources a été effectuée en injectant directement une concentration de 10 µg/mL de chacune des nitrosamines. La détection des m/z de chaque nitrosamine a été déterminée. Les ions produits en mode d'ionisation positif sont le résultat de l'ajout d'un H^+ , formant la molécule protonée $(M+H)^+$.

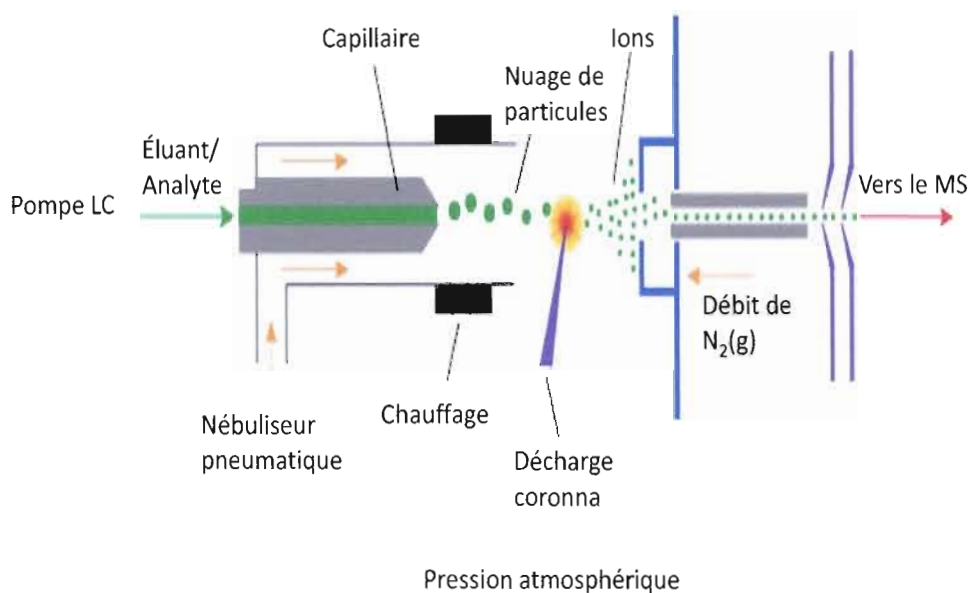


Figure 3.11 Schéma d'une interface d'ionisation APCI [University of Bristol, 2005]

La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP/MS-MS) est une technique d'une grande sensibilité. Dans cette technique, les composés sont analysés suivant leur ratio masse/charge qui est spécifique à chaque ion, ce qui confère une grande sélectivité à la méthode.

3.1.3.2.2 Optimisation de l'analyseur de masse

L'optimisation de l'analyseur de masse (trappe ionique) nécessite deux fragments m/z qui sont m/z 75 et 115, appelés masses ciblées dans la partie qui suit. Ces masses ciblées sont produits par la nitrosodiméthylamine (NDMA) m/z 75 et le nitrosopipiridine (NPIP) respectivement. L'optimisation s'est faite par infusion directe en MS en utilisant une pousse-seringue (Harvard Apparatus 22) avec un débit de 15 μL / min.

Ces deux masses ciblées couvrent deux groupes de composés de nitrosamines étudiées à savoir fragment m/z 75 pour la nitrosodiméthylamine (NDMA), la nitrosodiéthylamine (NDEA), la nitrosométhylethylamine (NMEA), la nitrosomorpholine (NMOR) et fragment m/z 115 pour la nitrosdipropylamine (NDPA), la nitrosodibutylamine (NDBA), la nitrosopipéridine (NPIP) et la nitrosopyrrolidine (NPYR). Avec ce choix, un meilleur signal est obtenu pour l'ensemble des huit nitrosamines.

Les paramètres optimaux pour l'analyse par spectrométrie de masse sont présentés dans le tableau 3.7

Tableau 3.7 Paramètres optimaux pour l'analyse par MS des nitrosamines

APCI-MS		
Source d'ionisation		
Pression, gaz de nébulisation (N ₂)	60 psi	
Débit, gaz de séchage (N ₂)	5 L/min	
Température du capillaire	350 °C	
Température d'évaporation	450 °C	
Tension du capillaire	4000 V	
Corona	+4000 nA	
Analyseur de masse		
	Nitrosodiméthylamine (NDMA)	Nitrosopipiridine (NPIP)
m/z ciblé	75	115
Échantillonneur no. 1	13, 7 V	17,8 V
Échantillonneur no. 2	6 V	6 V
Lentille accélératrice de sortie du capillaire	53,6 V	67,6 V
Octapole	2,16 V	2,23 V
Octapole RF	60,5 Vpp	105,9 Vpp
Octapole Δ	3,54 V	2,4 V
Vitesse de la trappe	40,9 v/s	23,4 v/s
Lentille no. 1	-5 V	
Lentille no. 2	-60 V	
Mode de balayage	Balayage répétitif	
Vitesse de balayage	300 ms	
Champs de balayage	m/z 70 à 170	
Cible	50000	

CHAPITRE IV

VALIDATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE

Afin d'assurer la conformité d'une méthode avec les réglementations nationales et internationales, des méthodes d'analyse fiables sont requises. Par conséquent, un laboratoire est dans l'obligation de s'assurer de sa capacité à fournir des résultats d'analyse du niveau de qualité requis. Pour cela, le laboratoire se doit de valider ses méthodes selon un protocole établi. D'une façon générale, la validation devrait vérifier que les performances de la méthode répondent aux besoins dans tout le domaine de concentration de l'analyte et pour tous les types d'échantillons auxquels elle s'applique. Il s'en suit que ces données devraient être parfaitement précisées avant de procéder à une quelconque validation et être accompagnées d'une énonciation de tout critère d'aptitude à l'essai.

En développement de méthode d'analyse et dans le domaine de la chimie analytique en général, la validation de méthode fait partie du programme d'assurance qualité. C'est une composante de mesure essentielle qui doit être mise en œuvre notamment, pour fournir la preuve de la fiabilité d'une méthode d'analyse utilisée.

La validation de la méthode d'analyse développée dans le cadre de ce projet s'est faite selon la méthode I-G-020 de l'IRSST, laquelle est elle-même basée sur des documents de NIOSH et OSHA. La performance des méthodes d'analyse est évaluée sous différents aspects :

- Efficacité d'extraction/récupération (désorption) ;
- Précision (Fidélité)
- Limite de détection et de quantification ;
- Domaine d'étalonnage et d'applicabilité ;
- Sensibilité ;
- Effet de matrice.

4.1 Détermination de l'efficacité d'extraction/récupération (désorption)

Les nitrosamines adsorbées sur le Florisil® sont récupérées par désorption avant l'analyse. Afin de connaître le pourcentage de récupération de cette méthode, une détermination de l'efficacité d'extraction/récupération est effectuée. Cette méthode validée selon le protocole I-G-020 de l'IRSST, permet de savoir la quantité de nitrosamines récupérées lors de la désorption.

Ces essais consistent en la comparaison de la quantité de nitrosamines récupérées par la solution de désorption à la quantité de nitrosamines initialement ajoutée au milieu adsorbant.

Pour ce faire, un volume connu (selon la quantité voulue) d'un mélange des huit nitrosamines est ajouté à environ 500 mg de Florisil® avant de rajouter 1,5 mL de la solution de désorption. Pour chaque quantité ajoutée, une solution de concentration équivalente est préparée et sera analysée telle quelle sans être en contact avec le Florisil®. La désorption s'est effectuée comme mentionné dans la partie Matériels et Méthode.

Les essais ont été effectués pour six niveaux de concentration (30 ng/mL, 60 ng/mL, 100 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL et 1000 ng/mL) répétés six fois, chacun tel que le degré de liberté est égale à 35 supérieur à 24 qui est le degré de liberté minimum afin de déterminer et de s'assurer de la méthode adéquate.

L'efficacité de l'extraction/récupération se base sur l'expression

$$E_E = M_R / M_S$$

Avec E_E : Efficacité d'extraction/ récupération

M_R : Quantité de nitrosamines récupérées après désorption

M_S : Quantité de nitrosamines ajoutées sans désorption

Tableau 4.1 Efficacité d'extraction / récupération de nitrosamine

Composé	E_E (%)*	Écart-type (%)**
NDMA	96,8	2,1
NDBA	95,5	6,8
NDEA	96,4	2,6
NDPA	97, 6	4,3
NMEA	98,4	11,3
NMOR	99,5	2,1
NPIP	90,2	4,3
NPYR	96,3	2,7

*Le résultat obtenu est constant dans l'intervalle de concentrations analysées.

** L'écartype est obtenus à partir des analyses en triplicata.

Pour que la méthode d'extraction soit considérée adéquate, le coefficient de récupération doit être supérieur à 75%. Avec cette méthode, les coefficients d'extraction/ récupération obtenus sont supérieurs tous à 90% (tableau 4.1).

Les pourcentages de récupération sans utilisation d'étalon interne se rapprochent de 100% pour la majorité des composés sauf pour la nitrosopiperidine (NPIP) où la récupération se fait avec un facteur de 10% de moins. Dans ce cas, l'utilisation d'étalon interne (deuté) n'est pas requise sauf pour la nitrosopiperidine (NPIP).

4.2 Précision (Fidélité)

4.2.1 Réplicabilité et répétabilité

La précision consiste à évaluer l'écart entre les résultats obtenus pour chaque analyse d'un même échantillon. Les erreurs de mesures analytiques pouvant provenir autant de l'échantillon et de l'instrumentation que des manipulations effectuées par le personnel du laboratoire.

La réplicabilité détermine la capacité d'une méthode à être précise sous les mêmes conditions. Ce paramètre a été déterminé par l'analyse de cinq niveaux de concentration (100 ng/mL, 200 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL et 1000 ng/mL), six fois le même jour, par le même analyste et avec le même instrument. Cela sert à déterminer la précision de la méthode sans prendre en considération les changements extérieurs qui peuvent influencer l'analyse (Tableau 4.2).

La répétabilité comprend des contributions de toutes les étapes de la procédure qui varient au cours d'une série. Contrairement à réplicabilité, ce paramètre prend en considération les variations supplémentaires quotidiennes du système analytique, comme un changement de l'analyste, des lots, des réactifs, du réétalonnage des instruments, ainsi que de l'environnement du laboratoire (Tableau 4.2). Ce paramètre a été déterminé par l'analyse de cinq niveaux de concentration (100 ng/mL, 200 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL et 1000 ng/mL) six fois à des journées différentes par deux différents analystes.

Tableau 4.2 Pourcentage de répliquabilité / répétabilité de la méthode

Composé	Répliquabilité (%)	Répétabilité (%)
NDMA	1,1	2,7
NDBA	4,7	4,7
NDEA	2,1	3,1
NDPA	0,9	2,6
NMEA	1,4	2,4
NMOR	1,6	3,3
NPIP	4,3	4,1
NPYR	1,6	1,8

Pour que la répliquabilité et la répétabilité obtenues soit acceptables, il faut que ces paramètres soit inférieurs à 10%, ce qui est le cas dans cette validation (Tableau 4.2).

4.2.2 Limites de détection et de quantification

4.2.2.1 Limite de détection méthodologique (LDM)

La limite de détection est définie comme étant la plus petite quantité ou concentration de l'analyte dans l'échantillon d'essai que l'on peut distinguer du bruit de fond de façon fiable. Elle se définit comme étant trois fois l'écart-type des concentrations obtenues lors de l'analyse de même solution d'étalon de faible concentration (près de LDM) et se détermine comme suit [IRSST, 2009] :

$$\text{LDM} = 3 \times s \quad (\text{équation 3})$$

LDM : Limite de détection méthodologique

s : écart-type des concentrations

4.2.2.2 Limite de quantification méthodologique (LQM)

Il est parfois utile de déterminer une concentration en dessous de laquelle la méthode analytique ne peut pas fonctionner avec un degré acceptable de fidélité. On la définit parfois arbitrairement comme étant 10 fois de l'écart-type des concentrations obtenues lors de l'analyse d'une solution d'étalon de faible concentration (près de LDM) et est déterminée comme suit [IRSST, 2009]:

$$\text{LQM} = 10 \times s \quad (\text{équation 4})$$

LQM : Limite de quantification méthodologique

s : écart-type des concentrations

La limite de quantification est considérée comme la plus petite concentration qui peut être quantifiée de façon fiable.

Dans le cadre de ce projet, les limites de détection et de quantification méthodologiques ont été déterminées par l'analyse de dix répliques d'un échantillon de faible concentration en nitrosamines.

Les limites de détection et quantification obtenues par la méthode développée en CG-DAP ont été la source d'une première estimation, laquelle était de 30 ng/mL, soit la plus faible concentration pouvant être détectée en CLHP-SM. Le signal obtenu à cette concentration ne correspondait pas à un signal/bruit de 3:1. Cette première concentration s'est avérée trop faible pour être détectée avec certitude. Les deux autres concentrations choisies afin de déterminer la LDM de cette méthode sont 40 ng/mL et 60 ng/mL. La LDM et LQM sont calculées avec l'écart-type (s) des dix échantillons analysés (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 Limites méthodologiques

Composé*	Écart-type (%)	LDM ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	LQM ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
NDMA (40 ng/mL)	4,9	0,02	0,09
NDBA (40 ng/mL)	2,8	0,01	0,05
NDEA (60 ng/mL)	1,8	0,01	0,03
NDPA (40 ng/mL)	4,3	0,02	0,07
NMEA (60 ng/mL)	3,7	0,02	0,06
NMOR (60 ng/mL)	4,6	0,02	0,08
NPIP (40 ng/mL)	3,9	0,02	0,07
NPYR (40 ng/mL)	3,9	0,02	0,07

* Les concentrations mentionnées sont celle utilisées pour la détermination de la LDM et LQM pour chaque composé.

Les limites méthodologiques obtenues démontrent une bonne sensibilité de la méthode qui permet la détection et quantification de concentrations de nitrosamines inférieures à 10% de la valeur de référence.

4.2.3 Domaine d'étalonnage et d'applicabilité

Le domaine d'étalonnage est considéré comme la capacité d'une méthode d'analyse à donner une réponse instrumentale proportionnelle à la concentration des composés à doser dans l'échantillon. Il sert aussi à calculer la concentration des composés en question à partir de l'équation de la droite obtenue. Ce domaine, se situe entre la limite de détection de la méthode (LDM) et une limite supérieure de linéarité (LL). Cette dernière limite peut être déterminée par l'analyse de solutions étalons à des concentrations suffisamment élevées pour produire un plafonnement de la courbe d'étalonnage.

La courbe d'étalonnage a été construite par l'analyse de six solutions avec des concentrations allant de 40 ng/mL à 2000 ng/mL ce qui correspond respectivement à 0,07 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et 3,75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (pour un volume de désorption de 1,5 mL). Étant donné que la valeur de référence de nitrosamines recommandée par l'INSPQ est de 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, les points inférieurs et supérieurs de la courbe d'étalonnage sont représentés respectivement environ 7,0% et 400% de la valeur de référence en considérant un volume d'échantillonnage d'environ 800 L d'air (400 min d'échantillonnage à 2 L/min).

Tableau 4.4 Coefficients de corrélation obtenus avec une courbe d'étalonnage allant jusqu'à 2000 ng/mL (Annexe D)

Composé	R ²
NDMA	0,999
NDBA	0,999
NDEA	0,999
NDPA	0,999
NMEA	0,999
NMOR	0,999
NPIP	0,999
NPYR	0,999

Le tableau ci-dessus indique les coefficients de corrélation (R^2) obtenus et démontre que la méthode est linéaire même à environs 400% de la valeur de référence. La méthode s'avère applicable dans un intervalle de concentrations allant de 0,07 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à 1,75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ce qui correspond aux besoins de la méthode d'analyse qui a été développée.

CHAPITRE V

APPLICATION DE LA MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET D'ANALYSE EN MILIEU DE TRAVAIL

5.1 CLHP-MS vs CG-DAP

Comme mentionné dans la partie introduction, la méthode faisant appel au CG-DAP, malgré sa grande sensibilité, présente un risque au niveau de sa non- spécificité aux nitrosamines, ce qui peut constituer une importante limitation.

La présente section compare la méthode développée dans ce projet afin de vérifier la performance de l'instrumentation CLHP-MS par rapport à la méthode déjà implantée au laboratoire (CG-DAP). Au delà du fait que l'on veut établir que les deux méthodes produisent des résultats équivalents, la sensibilité (la capacité de la méthode à donner des résultats fiables en faibles concentrations) et la spécificité de la nouvelle méthode CLHP-MS en situation d'échantillonnage d'air ont été étudiées.

5.1.1 Comparaison des deux méthodes

Deux types d'échantillonnages ont été effectués afin de générer des paires d'échantillons à analyser par les deux méthodes. Le premier type d'échantillonnage était effectué en laboratoire, utilisant la procédure décrite à la section 1.1.1.1. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.1 ci-dessous. Le deuxième type d'échantillonnage a été effectué en milieu de travail selon la procédure décrite à la section 1.1.1.2. Les résultats obtenus pour ces échantillons sont présentés aux tableaux 5.2 à 5.23.

5.1.1.1 Comparaison en laboratoire

Dans une chambre en verre, un volume de 1 mL d'un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ aux deux premiers essais (concentration théorique de 125 $\mu\text{g/m}^3$ dans la chambre de verre) et un volume de 1 mL d'un mélange des huit nitrosamines d'une concentration de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (62,5 $\mu\text{g/m}^3$) pour un troisième essai, ont été évaporés. La chambre présente trois sorties (Figure.8) et à chacune des sorties sont connectées deux tubes d'échantillonnage INRS modifiés grâce à un connecteur en « Y » qui permet un échantillonnage en parallèle (un tube à analyser en CG/DAP et un autre à analyser en CLHP/MS), comme décrit dans la partie Matériel et Méthode (section 2.1.2.2.1). Le temps d'échantillonnage est de 120 minutes avec un débit de 0,1 L/min pour un volume d'échantillonnage de 12 L (0,012 m^3) (Figure 2.4).

Le tableau 5.1 ci-dessous présente les résultats comparatifs obtenus pour chaque échantillonnage.

Tableau 5.1 Comparaison des quantités obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors de trois échantillonnages simulés à l'IRSST (temps d'échantillonnage = 120 min, débit = 0,1 L/min, volume d'échantillonnage = 0,012 m³)

Quantité évaporée	1µg				1µg				0,5 µg			
	Essai 1				Essai 2				Essai 3			
	CLHP-MS µg/m ³ (é.t.)	CG-DAP µg/m ³ (é.t.)	écart %		CLHP-MS µg/m ³ (é.t.)	CG-DAP µg/m ³ (é.t.)	écart %		CLHP-MS µg/m ³ (é.t.)	GC-DAP µg/m ³ (é.t.)	écart %	
NDMA	120,0 (2,9)	101,3 (1,7)	15,6		57,5 (1,7)	68,8 (2,7)	19,7		<0.001* (-)	18,8 (1,3)	-	
NDBA	16,3 (1,5)	<0.001* (-)	-		<0.001* (-)	<0.001* (-)	-		<0.001* (-)	<0.001* (-)	-	
NDEA	115,0 (1,5)	92,5 (1,9)	19,6		56,3 (2,1)	63,8 (1,3)	13,3		<0.001* (-)	18,8 (1,1)	-	
NDPA	63,8 (1,9)	43,8 (0,7)	31,3		27,5 (0,9)	31,3 (1,8)	13,8		<0.001* (-)	<0.001* (-)	-	
NMEA	117,5 (2,0)	97,5 (2,1)	17,0		60,0 (2,2)	67,5 (0,2)	12,5		12,5 (1,3)	17,5 (1,0)	-	
NMOR	33,8 (0,8)	27,5 (1,8)	18,6		17,5 (2,0)	20,0 (1,0)	14,3		<0.001* (-)	<0.001* (-)	-	
NPIP	42,5 (2,2)	26,3 (2,3)	38,1		20,0 (1,8)	18,8 (1,8)	6,0		<0.001* (-)	<0.001* (-)	-	
NPYR	25,0 (1,9)	20,0 (1,5)	20,0		13,8 (1,7)	15,0 (1,9)	8,7		<0.001* (-)	<0.001* (-)	-	

* valeur inférieur à la limite de quantification (Calculer selon les conditions citées plus haut, voir annexe C pour calcul)

Dans le but d'alléger les tableaux et de faciliter la lecture des résultats, une moyenne a été prise étant donné la faible variation de ces derniers.

Pour le 3^{ème} échantillonnage, les concentrations obtenues par CLHP-MS sont inférieures à la limite de quantification méthodologique sauf pour la nitrosométhyléthylamine tandis que par CG-DAP, il a été possible de quantifier en plus la nitrosodiméthylamine et la nitrosodiéthylamine. Ces résultats peuvent aussi être expliqués par la faible concentration de nitrosamine évaporée (0,5 µg/mL) dans la chambre de verre. Ce test ne permet pas de comparer les trois essais vu les différents résultats obtenus, par contre il permet de comparer les résultats obtenus par CLHP-MS et CG-DAP. De ces résultats il peut être conclu que la méthode de CG-DAP est plus sensible que celle développée par CLHP-MS si les échantillons analysés proviennent de nitrosamines « pures » évaporées, autrement dit, des échantillons « propres ».

Mise à part la sensibilité de la méthode, les variations observées peuvent être due à plusieurs facteurs comme l'échantillonnage. Même si l'échantillonnage et la comparaison se font par des tubes INRS modifiés connectés en parallèle, des variations entre les résultats appariés peuvent s'expliquer par la non-homogénéité des nitrosamines présentes dans l'air échantillonné. Les nitrosamines évaporées ne se retrouveraient pas d'une façon uniforme dans la chambre en verre, ce qui pourrait induire l'échantillonnage d'un même volume d'air qui contient plus ou moins la même quantité de nitrosamines.

5.1.1.2 Comparaison en milieu de travail

Trois échantillonnages en parallèle ont été effectués en milieu de travail. Les trois entreprises ayant collaborées œuvrent dans le domaine du caoutchouc, tant au niveau de lignes de production de caoutchouc (extrusion) et de moulage, où l'on retrouve l'étape de cuisson (vulcanisation), qu'au niveau de l'entreposage de produit de caoutchouc. Par souci de confidentialité, les trois entreprises sont nommées A, B et C. Chaque paire d'échantillons était constituée de deux tubes d'échantillonnages connectés à leur pompe respective et était installée soit en poste fixe ou en poste personnel, i.e. installée sur un travailleur. Pour chacune des paires, un tube était analysé par CLHP-MS et l'autre par GC-NPD. Les résultats obtenus sont présentés aux tableaux 5.2 à 5.23.

Tableau 5.2 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Cafétéria, temps d'échantillonnage = 485 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,97 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,50	0,23	54
NDBA	0,23	0,28	22
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,09*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	0,10	0,10	0
NPIP	<0,09*	<0,06*	-
NPYR	<0,09*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.3 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Bureau, temps d'échantillonnage = 479 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,96 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,48	0,35	27
NDBA	0,24	0,26	8
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,09*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	0,10	-
NPIP	<0,09*	<0,06*	-
NPYR	<0,09*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.4 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de chariot élévateur clients, temps d'échantillonnage = 466 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,93 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,88	0,40	54
NDBA	0,34	0,35	3
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,06*	<0,06*	-
NMEA	<0,08*	<0,04*	-
NMOR	0,22	0,23	4
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	<0,08*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.5 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt A de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de chariot élévateur clients, temps d'échantillonnage = 474 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,95 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,75	0,28	62
NDBA	0,26	0,24	8
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,09*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	0,14	0,18	28
NPIP	<0,09*	<0,06*	
NPYR	<0,09*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.6 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 428 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,85 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,36	<0,03*	-
NDBA	0,23	<0,05*	-
NDEA	<0,05*	<0,05*	-
NDPA	<0,08*	<0,05*	-
NMEA	<0,05*	<0,04*	-
NMOR	<0,05*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,05*	-
NPYR	0,25	<0,05*	-

*LQM

Tableau 5.7 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 415 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,79 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,23	<0,02*	-
NDBA	0,15	<0,05*	-
NDEA	<0,05*	<0,05*	-
NDPA	<0,07*	<0,05*	-
NMEA	<0,05*	<0,04*	-
NMOR	<0,05*	<0,04*	-
NPIP	<0,07*	<0,05*	-
NPYR	<0,07*	<0,05*	-

*LQM

Tableau 5.8 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 416 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,83 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,47	<0,02*	-
NDBA	0,14	<0,05*	-
NDEA	<0,05*	<0,05*	-
NDPA	<0,07*	<0,05*	-
NMEA	<0,05*	<0,04*	-
NMOR	<0,05*	<0,04*	-
NPIP	<0,07*	<0,05*	-
NPYR	0,18	<0,05*	-

*LQM

Tableau 5.9 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Cafétéria, temps d'échantillonnage = 465 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,93 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,14	<0,03*	-
NDBA	0,10	0,11	10
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	DT	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	<0,08*	<0,06*	-

*DT : Difficulté technique

*LQM

Tableau 5.10 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Trimeuses, temps d'échantillonnage = 457 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,92 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,15	0,03	-
NDBA	<0,08*	<0,06*	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	DT	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	0,41	<0,06*	-

*DT : Difficulté technique

Tableau 5.11 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Bureau, temps d'échantillonnage = 448 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,89 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	<0,08*	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	0,11	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	<0,08*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.12 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de chariot élévateur, temps d'échantillonnage = 443 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,88 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	<0,08*	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	<0,04*	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	DT	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	<0,08*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.13 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Poste fixe, temps d'échantillonnage = 451 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,90 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	<0,08*	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	<0,04*	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	<0,08*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.14 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt B de caoutchouc (Emplacement : Frigidaire, temps d'échantillonnage = 125 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,25 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	<0,08*	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	<0,04*	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	<0,08*	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.15 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Personnel, temps d'échantillonnage = 365 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,73 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	<0,08*	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	<0,04*	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	<0,06*	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	0,14	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.16 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Table tournante, temps d'échantillonnage = 364 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,73 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,23	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	0,08	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	1,09	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	2,45	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.17 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Opérateur de presse, temps d'échantillonnage = 372 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,77	0,30	61
NDBA	0,20	0,22	10
NDEA	<0,06*	0,08	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	1,58	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	2,41	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.18 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Chariot élévateur, temps d'échantillonnage = 373 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,75 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,77	0,40	48
NDBA	0,23	0,22	4
NDEA	<0,06*	0,19	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	0,44	<0,04*	-
NMOR	0,48	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	0,21	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.19 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Découpe, temps d'échantillonnage = 375 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,75 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	1,19	0,40	66
NDBA	0,23	0,22	4
NDEA	<0,06*	0,11	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	1,44	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	0,19	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.20 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Découpe, temps d'échantillonnage = 369 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,47	0,25	45
NDBA	0,17	0,16	6
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	0,33	<0,04*	-
NMOR	0,20	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	1,53	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.21 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Table tournante, temps d'échantillonnage = 370 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,22	0,08	63
NDBA	0,09	0,09	0
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	0,75	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	<0,04*	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	1,71	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.22 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Moulage, temps d'échantillonnage = 367 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,73 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,53	<0,03*	-
NDBA	<0,08*	<0,04*	-
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	0,82	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	0,10	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	1,77	<0,06*	-

*LQM

Tableau 5.23 Comparaison des concentrations obtenues par CG-DAP et CLHP-MS lors d'un échantillonnage effectué dans l'entrepôt C de caoutchouc (Emplacement : Bureau, temps d'échantillonnage = 371 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,74 m³)

	LC-MS µg/m ³	GC-NPD µg/m ³	écart %
NDMA	0,42	0,24	43
NDBA	0,14	0,18	28
NDEA	<0,06*	<0,06*	-
NDPA	<0,08*	<0,06*	-
NMEA	0,38	<0,04*	-
NMOR	<0,06*	0,06	-
NPIP	<0,08*	<0,06*	-
NPYR	1,35	<0,06*	-

*LQM

La comparaison entre les deux méthodes s'est effectuée à deux niveaux :

- Sensibilité de la méthode
- Sélectivité de la méthode

5.1.1.3 Sensibilité de la méthode

Les échantillonnages ont été effectués dans le but de déceler la présence ou pas de nitrosamines dans ces trois entrepôts. Les analyses démontrent que, pour la plupart des composés de nitrosamines visées par NIOSH, elles sont présentes avec de très faibles concentrations, et dans la majorité des cas inférieures à la limite de quantification (LQM).

Les résultats obtenus par l'échantillonnage dans l'entrepôt A (tableaux 5.2 à 5.5 montrent la présence du nitrosodiméthylamine, nitrosodibutylamine ainsi que nitrosomorpholine à de faibles concentrations. Les deux méthodes démontrent des concentrations sous la

limite de quantification pour les autres nitrosamines visées par l'analyse.

Les résultats obtenus par CG-DAP pour entrepôt B (tableaux 5.6 à 5.14) montrent, dans la majorité des cas, que la quantité de nitrosamines présente dans ce milieu est inférieure à la limite de quantification de la méthode d'analyse. Un large pic est observé, au même temps de rétention que celui de la nitrosodipropylamine, observée à trois emplacements à l'entrepôt B à savoir la cafétéria (tableau 5.9), trimeuses (Tableau 5.10) et opérateur de chariot élévateur (Tableau 5.12). Ce phénomène empêche l'identification de la nitrosodipropylamine et présente une difficulté technique. Ces difficultés techniques rencontrées sont discutées dans le chapitre suivant.

Une grande variation des résultats obtenus pour la NDMA est observée, dans tous les échantillons analysés. En CG-DAP, la NDMA est parmi les substances la mieux détectée et la plus abondante contrairement à l'analyse en CLHP-MS. Cependant, on peut observer dans les résultats obtenus que la concentration de NDMA est deux fois plus élevée par CLHP-MS qu'en CG-DAP. Cela est peut-être dû à un effet de matrice de l'échantillon provenant du milieu de travail. Une des difficultés de la nouvelle méthode développée est vue avec les résultats chromatographiques obtenues à de faibles concentrations. La forme des pics dans ces cas rend difficile l'intégration de ces derniers et donc l'obtention de résultats précis. En CLHP-MS, la nitrosodiméthylamine (NDMA) est un des composés les moins sensibles obtenu avec cette technique d'analyse. Par contre, la nitrosodibutylamine (NDBA) ainsi que la nitrosomorpholine (NMOR) sont deux composés qui répondent bien et donnent des résultats similaires pour l'analyse en CG-DAP et CLHP-MS. La nitrosodibutylamine (NDBA) fait partie des composés qui répondent le mieux en CLHP-MS. Pour les analyses faites pour les échantillons pris dans les entrepôts A, B et C, la nitrosodibutylamine a toujours été facile à identifier autant par CLHP-MS que par CG-DAP. Les chromatogrammes obtenus lors de ces analyses montrent que le pic de la nitrosodibutylamine est le seul à sortir à un temps de rétention de 30,6 minutes. Si on regarde le cas de la nitrosodibutylamine (NDBA) et la

nitrosomorpholine (NMOR), on peut remarquer que lorsque les pics visés ne sortent pas au même temps que d'autres pics en CG-DAP, les résultats obtenus en CG-DAP et CLHP-MS se rapprochent (Tableaux 5.1 à 5.23).

5.1.1.4 Sélectivité de la méthode

L'exemple de seulement deux échantillons a été pris afin d'alléger la lecture des résultats. Pour commencer, une comparaison peut être effectuée entre un chromatogramme obtenu en analysant des standards et un autre en analysant des échantillons réels par CG-DAP (Figures 5.1 et 5.2). Comme expliqué avant, le détecteur azote-phosphore est spécifique aux molécules organiques contenant des atomes d'azote et/ou phosphore. Ce dernier peut détecter des molécules autres que les nitrosamines présentes dans l'air d'échantillonnage comme le montrent les figures ci-dessous.

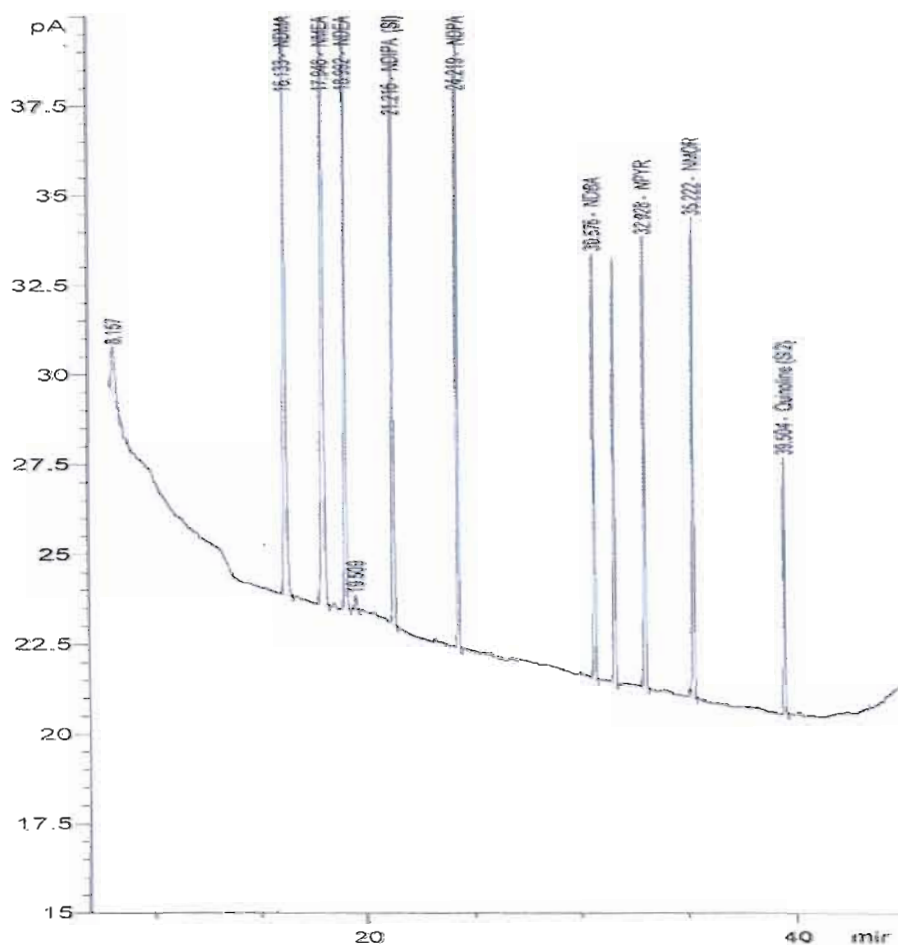


Figure 5.1 Chromatogramme d'un échantillon standard obtenu par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)

Plusieurs pics se chevauchent et peuvent engendrer des surestimations voir fausser les résultats. Des difficultés techniques (DT) ont été rapportées pour la NDPA (Tableaux 5.9, 5.10 et 5.12), parce que l'aire de ce pic n'a pu être estimée avec précision en raison d'une interférence chromatographique trop intense. La sélectivité de l'instrument CLHP-MS a été mise à profit dans ce cas-ci en démontrant une présence quasi nulle de la NDPA pour cet échantillon (Figure 5.6).

En faisant une comparaison entre les chromatogrammes obtenus par CG-DAP et CLHP-MS pour des échantillons pris parallèles (Figure 5.3 vs Figure 5.4 et Figure 5.5 vs Figure 5.6), cela met en évidence la limitation de la méthode de CG-DAP et confirme la sélectivité du détecteur MS. Comme déjà discuté dans les chapitres précédents, étant donné que le détecteur azote phosphore détecte toutes les molécules contenant de l'azote et/ou phosphore, on peut s'attendre à la détection de plusieurs autres composés qui se retrouvent dans le milieu d'échantillonnage. Cela explique le nombre de pics qui paraissent sur les chromatogrammes obtenus par CG-DAP. Ces pics peuvent sortir au même temps que ceux recherchés et peuvent éventuellement fausser les résultats d'analyse. Contrairement aux résultats obtenus par CLHP-MS où les chromatogrammes ne présentent que les pics des composés visés par l'analyse.

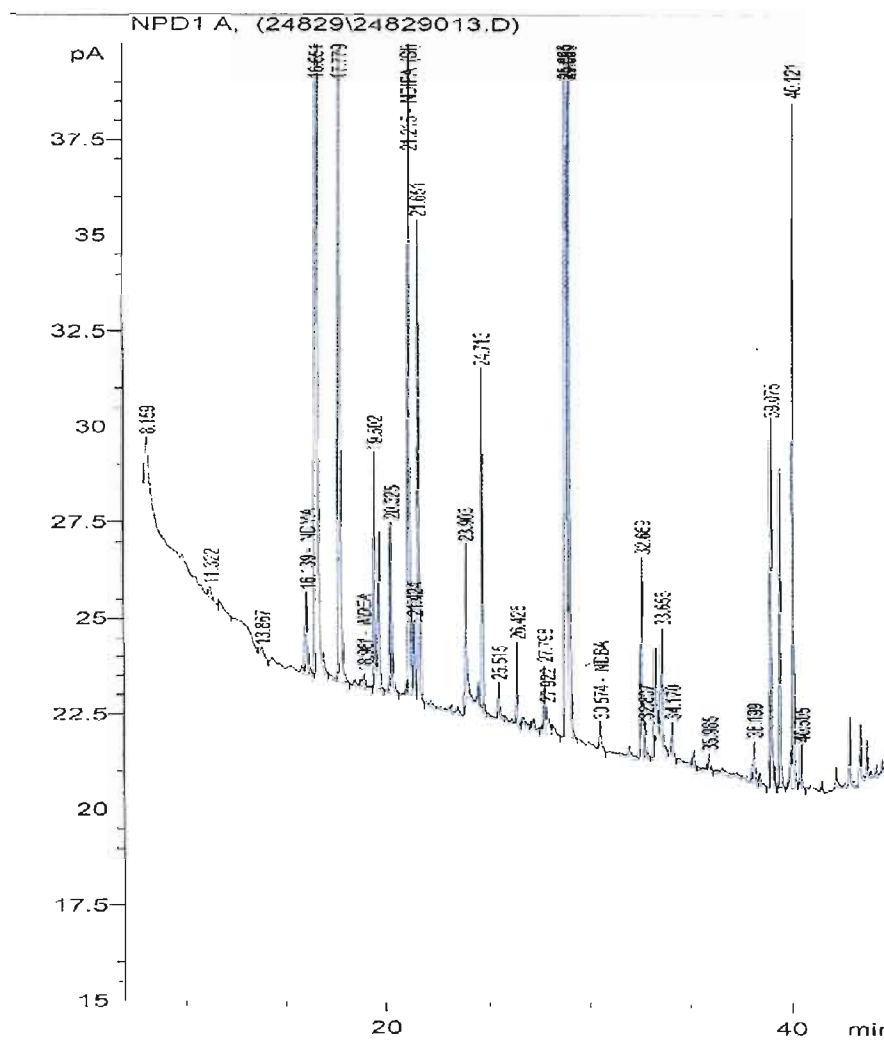


Figure 5.2 Chromatogramme obtenu par CG-DAP d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)

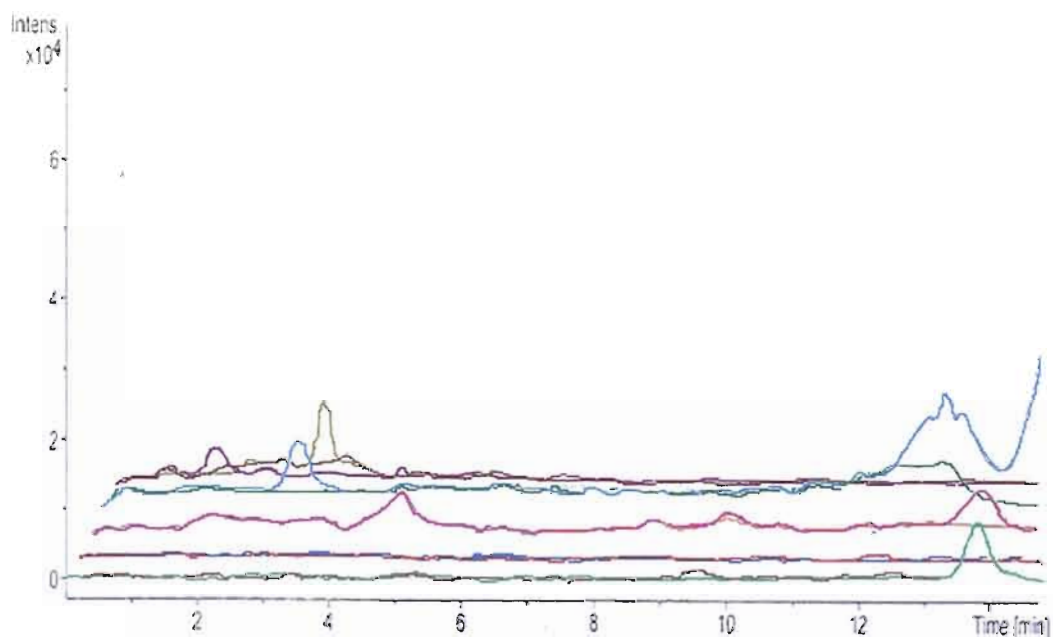


Figure 5.3 Chromatogramme obtenu par CLHP-MS d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 3.6)

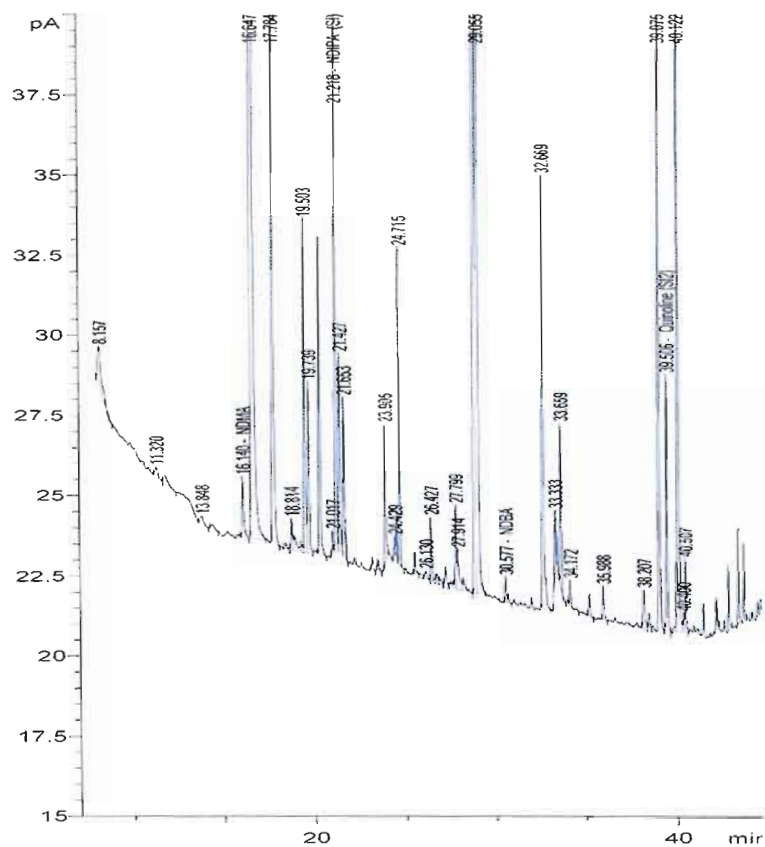


Figure 5.4 Chromatogramme obtenu par CG-DAP d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)

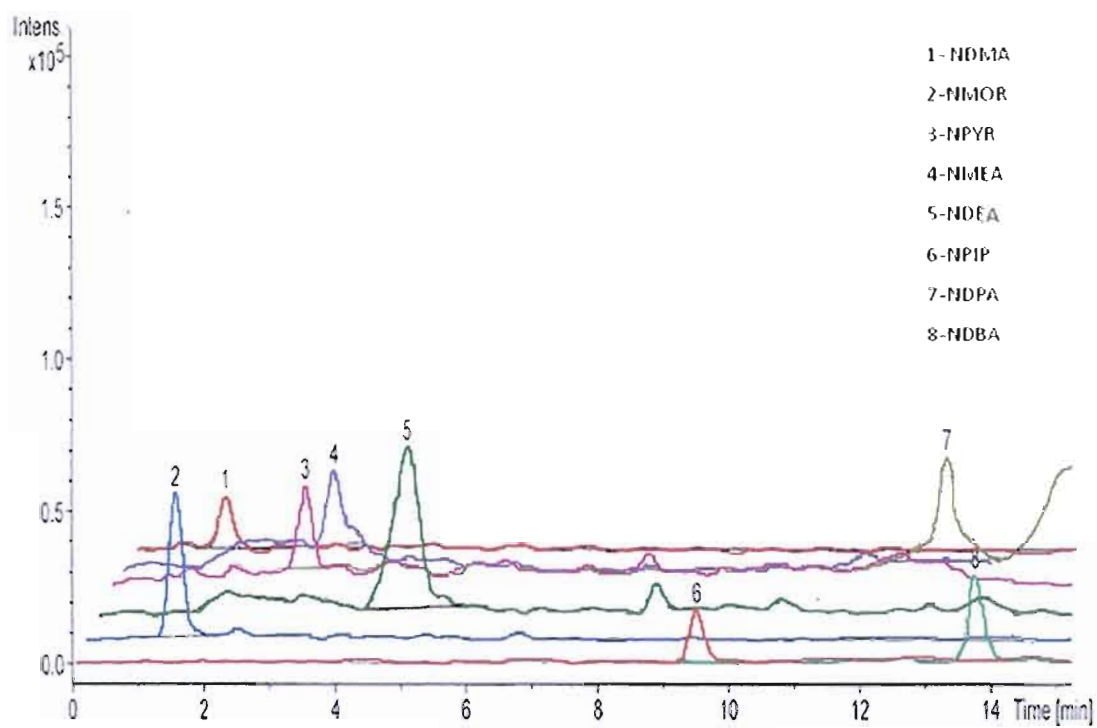


Figure 5.5 Chromatogramme obtenu par CLHP-MS d'un échantillon terrain (Conditions chromatographiques Tableau 3.6)

6 CONCLUSION

Une méthode d'analyse de huit nitrosamines, visées par NIOSH pour le risque qu'elles présentent pour la santé des travailleurs en milieu industriel, a été développée.

La méthode de désorption mise au point permet une récupération moyenne de 96% de nitrosamines captées par le Florisil®. Cependant, l'utilisation d'une solution de désorption contenant un mélange de solvants organiques différents ces solvants utilisés comme éluant, présente une limitation à la méthode. Cette différence de solvant provoque une certaine lenteur dans l'équilibre du soluté entre la phase mobile et stationnaire qui mène au dédoublement de certains pics. Ce dédoublement est de plus en plus visible avec l'augmentation du volume d'injection. Ce phénomène réduit la sensibilité de la méthode puis qu'on est confronté à réduire le volume d'injection et donc l'importance des pics.

Les résultats démontrent une détection spécifique et sensible pour certaines nitrosamines comme la nitrosodibutylamine (NDBA) et nitrosomorpholine (NMOR) lesquelles ont donné des résultats similaires à ceux obtenus par CG-DAP. Pour d'autres nitrosamines comme la nitrosodiméthylamine (NDMA), un problème de sensibilité se pose étant donné que ce pic n'est pas abondant en CLHP-MS alors que la sélectivité est problématique en CG-DAP pour les composés tels que la nitrosodiéthylamine (NDEA) et la nitrosométhyléthylamine (NMEA).

Lors de la validation de la méthode d'analyse, les limites de quantification obtenues lors des validations préliminaires de la méthode d'analyse par CLHP-SM varient de $0,03 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à $0,09 \mu\text{g}/\text{m}^3$ selon la nitrosamine pour un volume d'échantillonnage d'environ 1000 L. Les valeurs obtenues représentent respectivement 3 % à 9 % de la norme recommandée par l'INSPQ ($1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) pour 800 L de volume d'air échantillonné (400 minutes d'échantillonnage à 2 L/min). Le domaine d'applicabilité de la méthode est de

0,07 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à 1,75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ce qui couvre les concentrations visées par l'INSPQ.

APPENDICE A

**Chromatogrammes et spectres des nitrosamines standards analysés par
CLHP-MS (Conditions chromatographiques Tableau 3.6)**

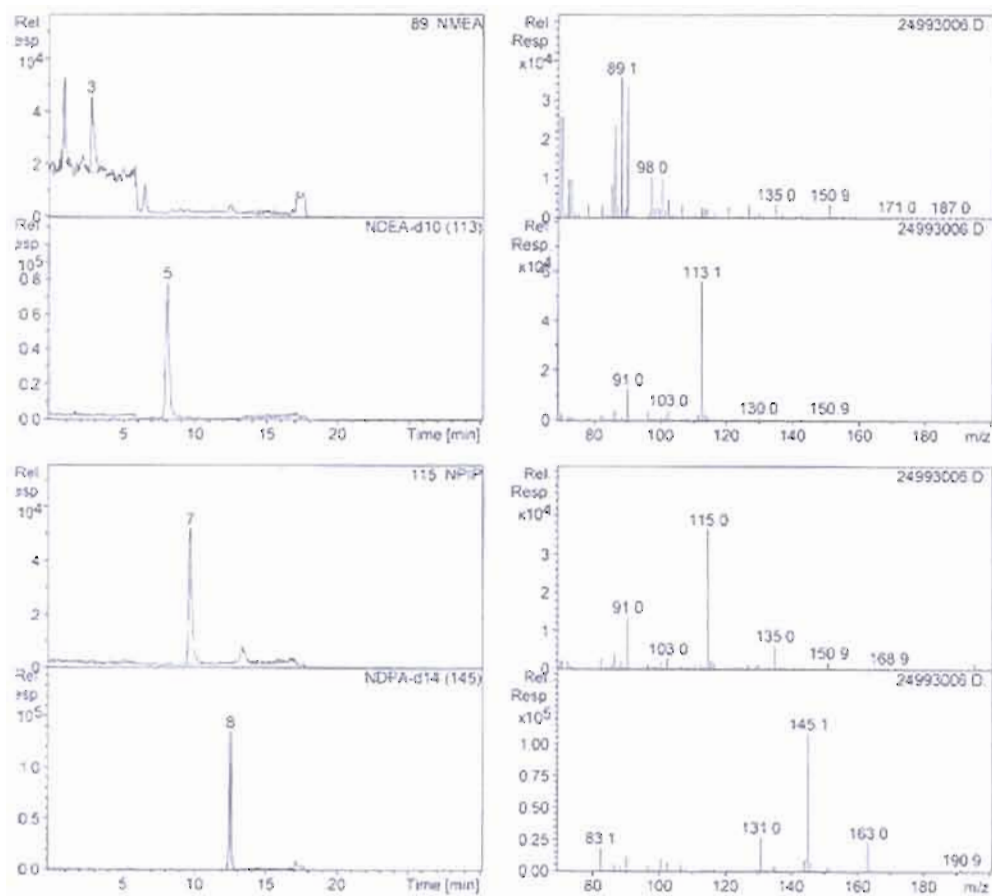


Figure A.1 Pics chromatographique et spectres MS du NMEA et NPPI ainsi que les standards internes NDEA-d10 et NDPA-d14

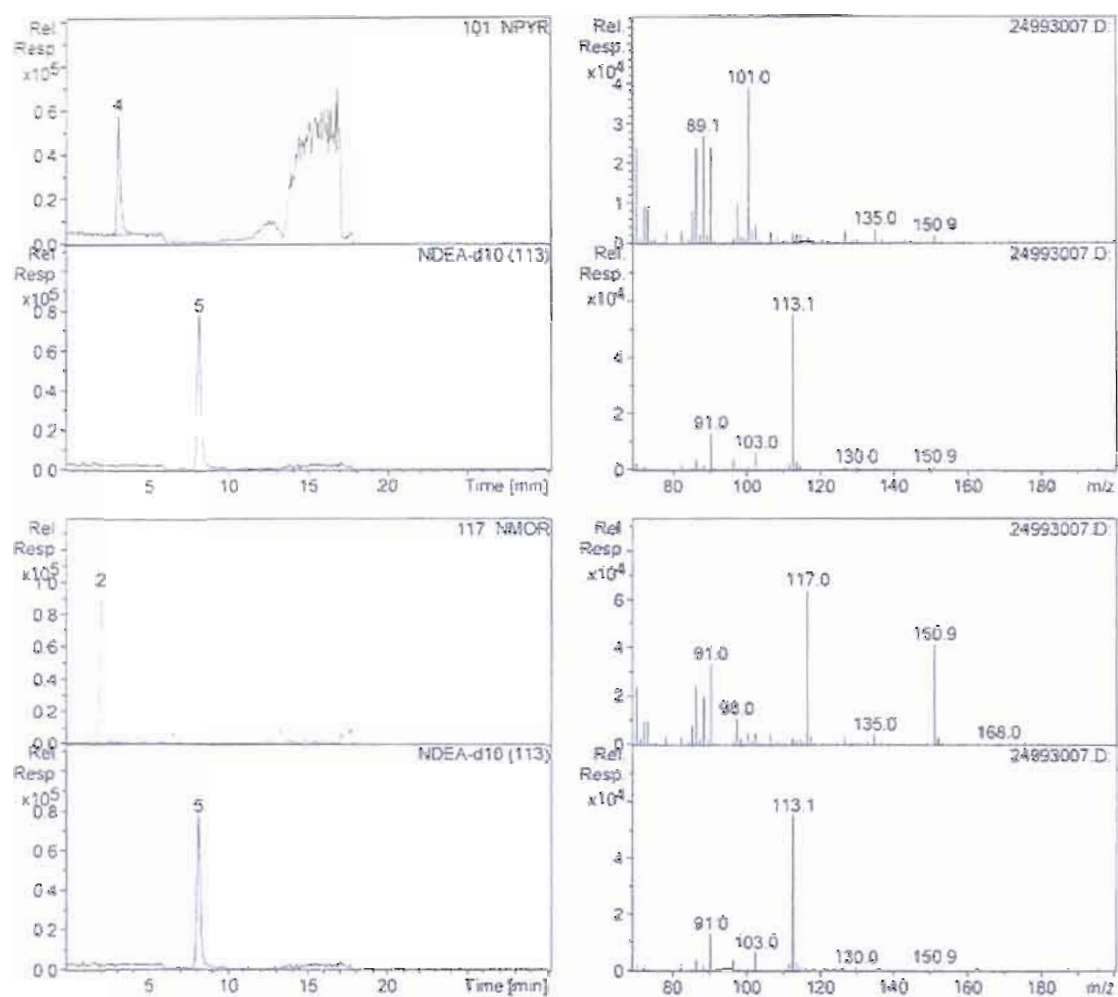


Figure A.2 Pics chromatographique et spectres MS du NPYR et NMOR ainsi que le standard interne NDEA-d10

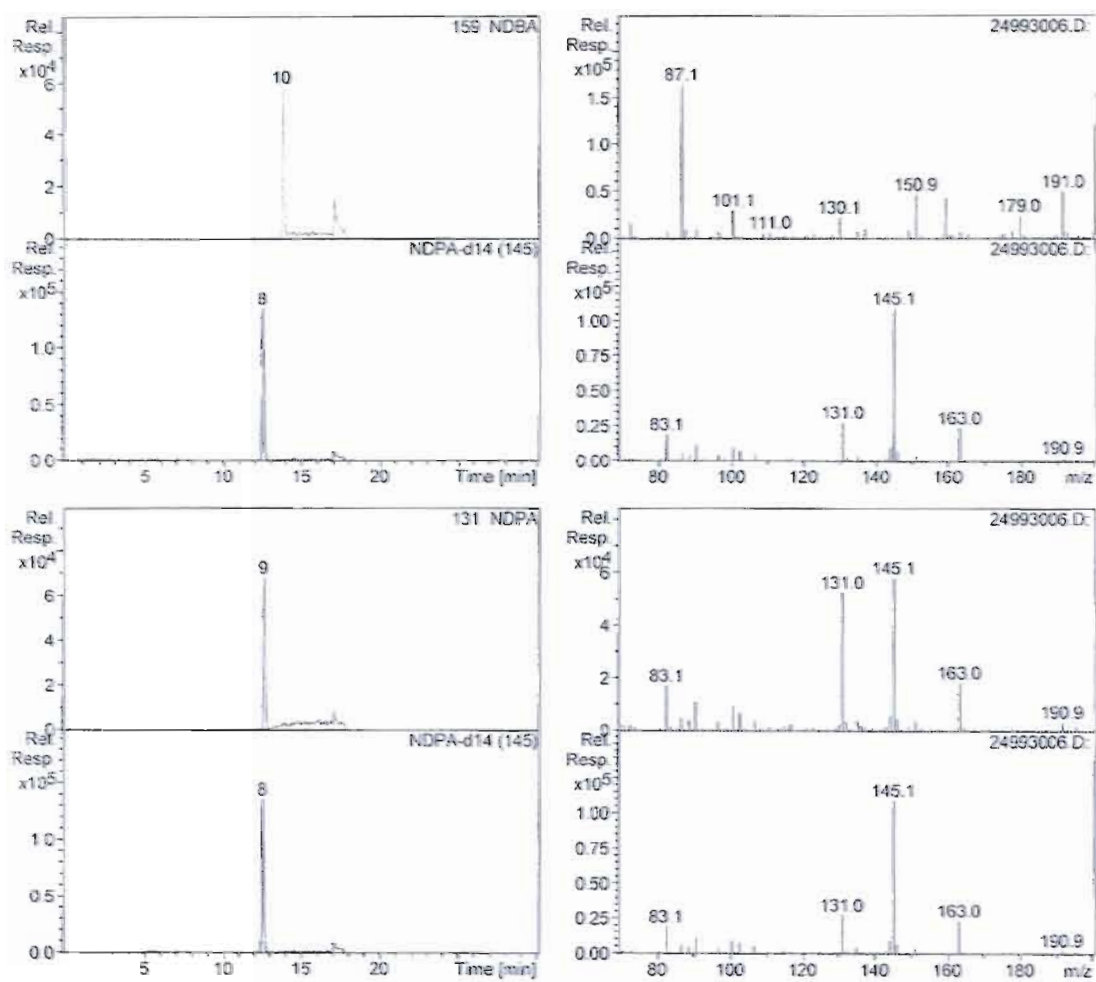


Figure A.3 Pics chromatographique et spectres MS du NDBA et NDPA ainsi que le standard interne NDPA-d14

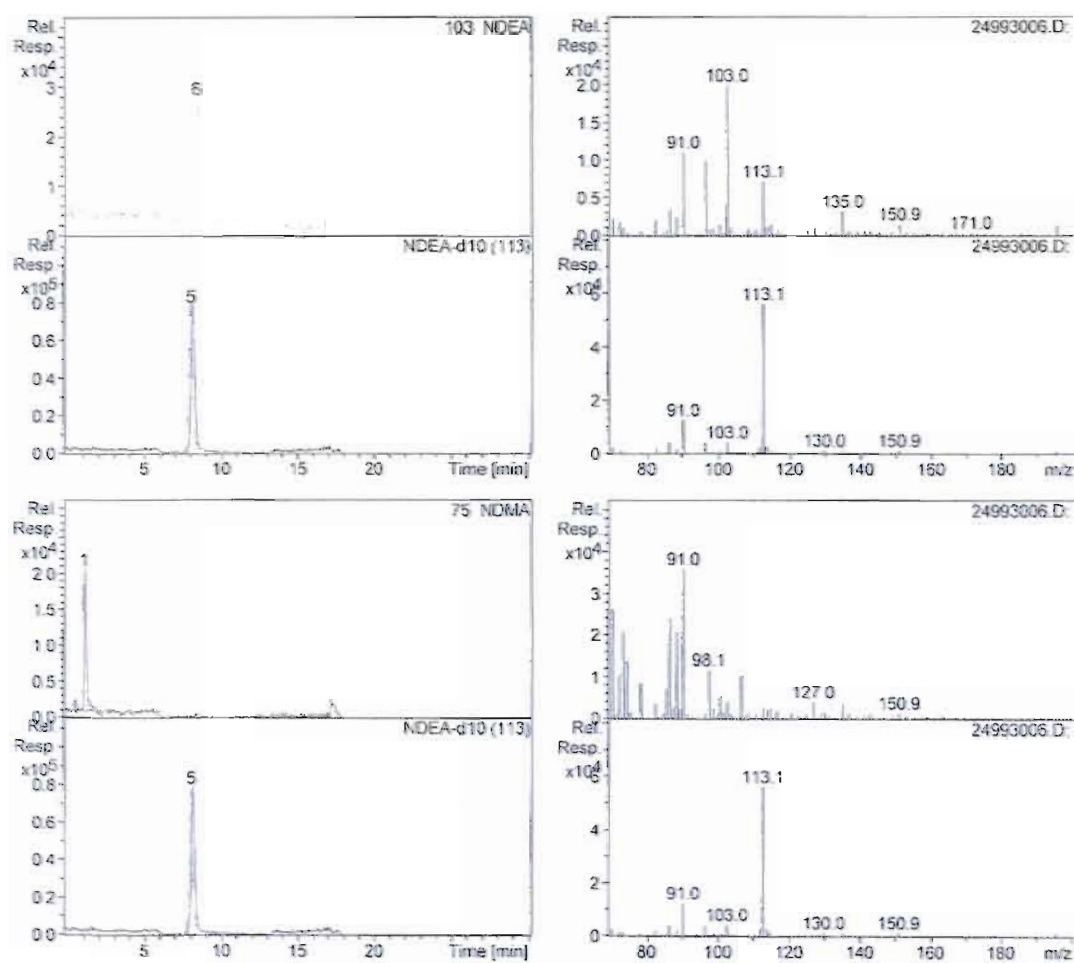
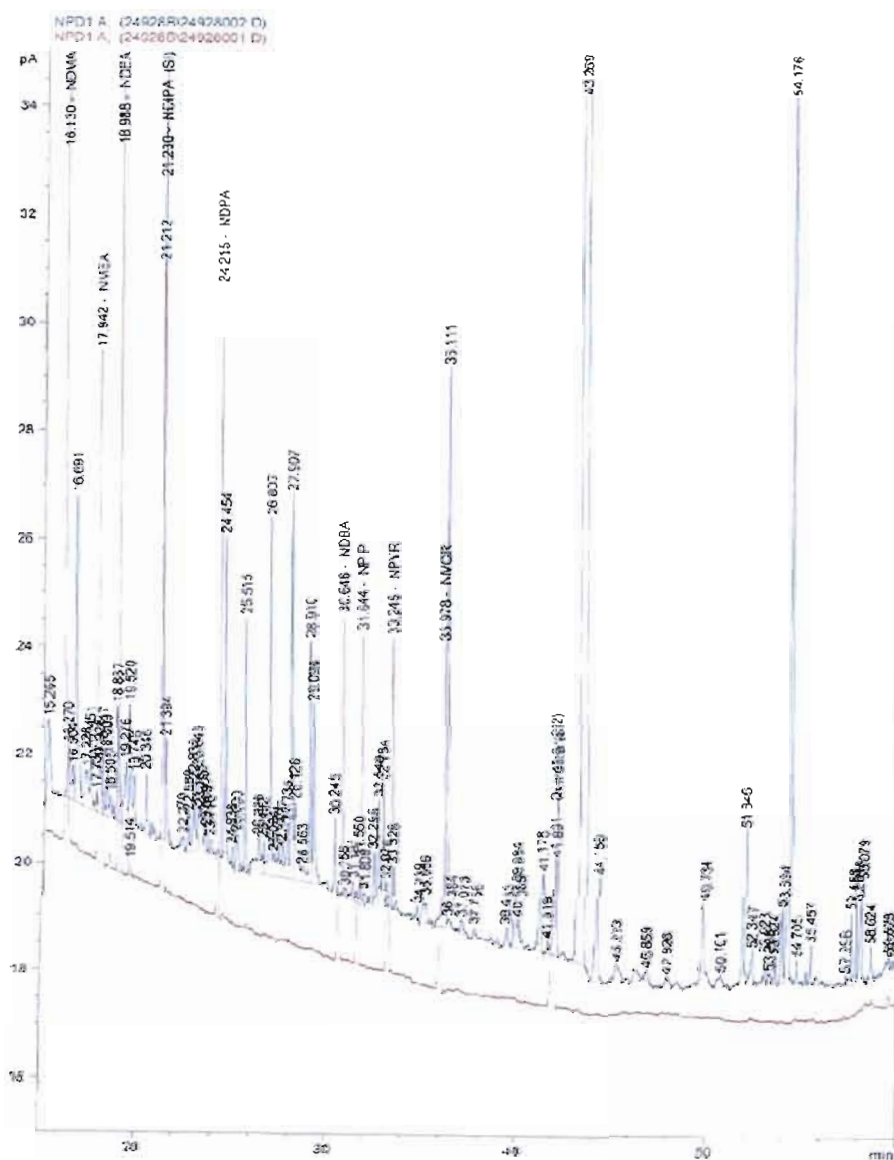


Figure A.4 Pics chromatographique et spectres MS du NDEA et NDMA ainsi que le standard interne NDEA-d10

APPENDICE B

Chromatogrammes d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)



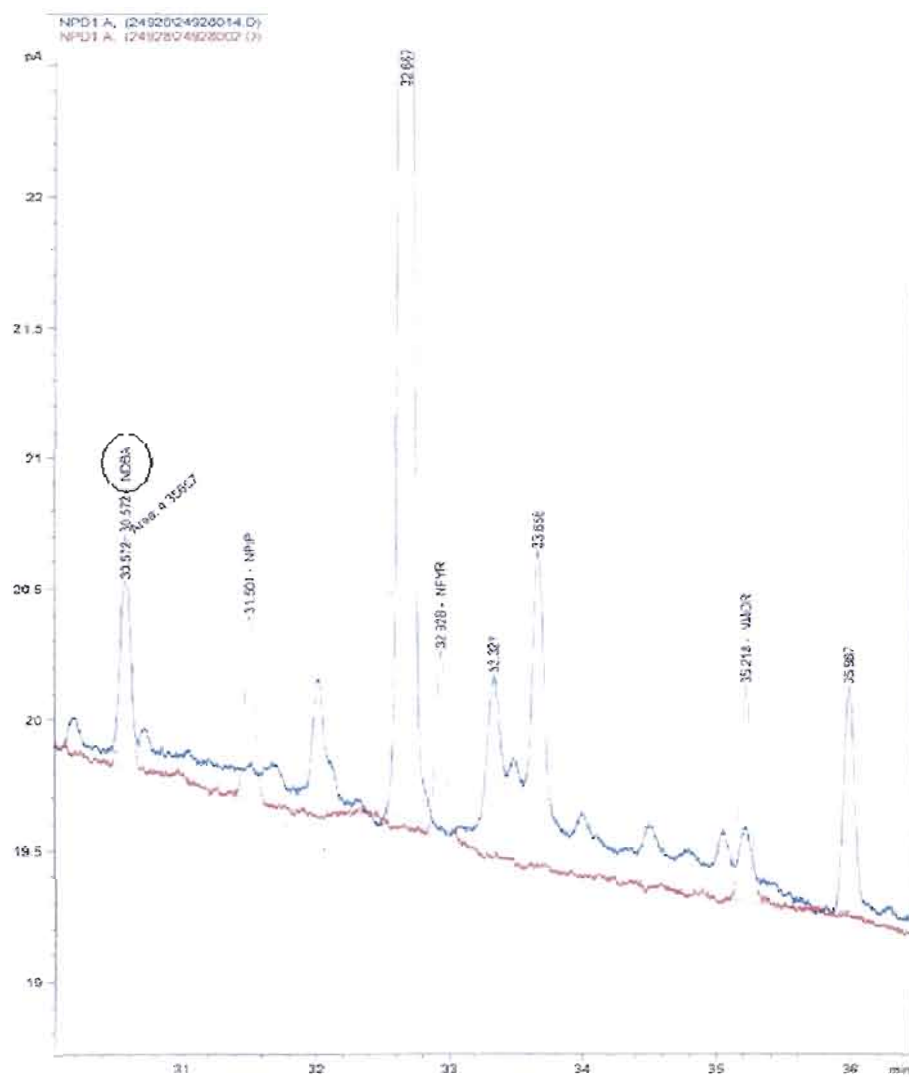


Figure B. 2 Agrandissement d'une zone du chromatogramme d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)

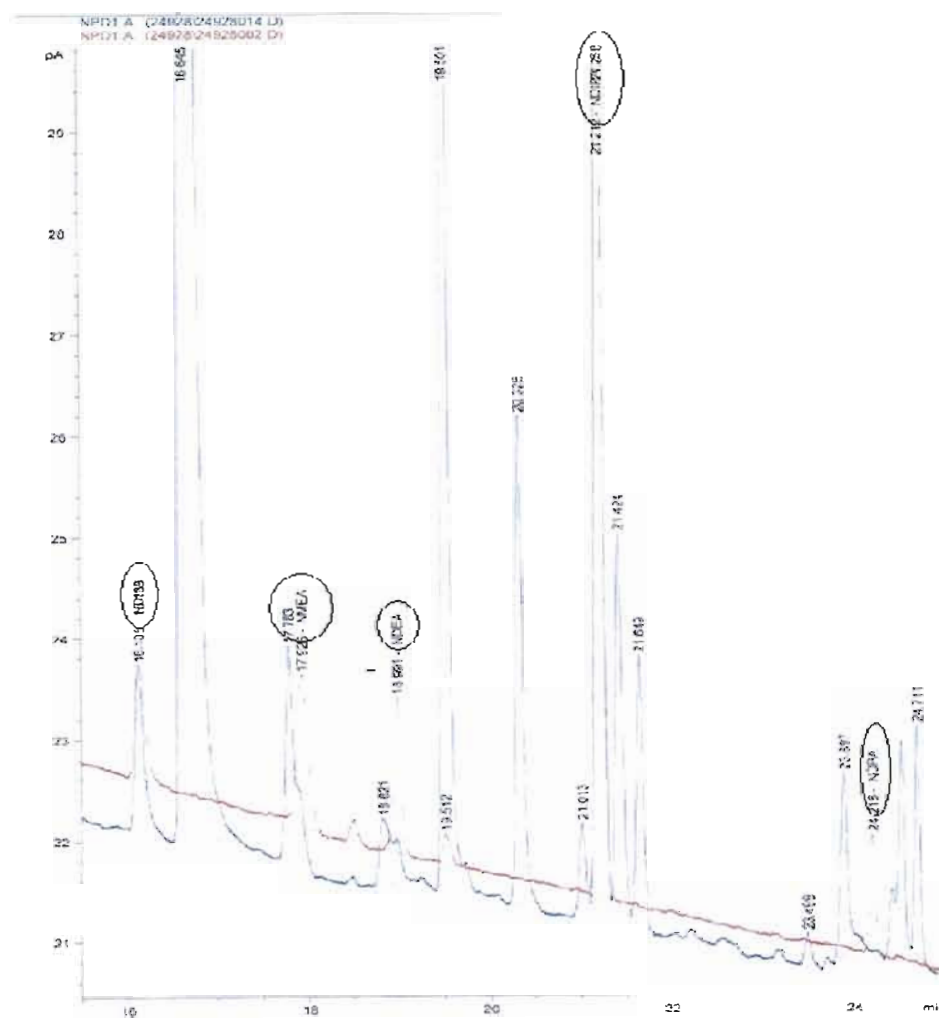


Figure B. 3 Agrandissement d'une zone du chromatogramme d'un échantillon terrain analysé par CG-DAP (Conditions chromatographiques Tableau 1.5)

APPENDICE C

Calculs et conversions

Conversion de la limite de quantification méthodologique

Exemple de calcul :

Exemple de conversion de la valeur de LQM de $\mu\text{g/ml}$ à $\mu\text{g/m}^3$ pour NDPA

La LQM pour NDPA = 40 ng/mL (0.040 $\mu\text{g/mL}$)

Volume d'extraction = 1,5 ml

Dans les conditions citées dans le tableau 5.1 pour un échantillonnage simulé à l'IRSST (temps d'échantillonnage = 120 min, débit = 0,1 L/min, volume d'échantillonnage = 0,012 m^3)

$$0,040 \mu\text{g/ml} * 1,5 \text{ ml} = 0,060 \mu\text{g}$$

$$0,060 \mu\text{g} / 0.012 \text{ m}^3 = 0,001 \mu\text{g/m}^3$$

Dans les conditions citées dans le tableau 5.2 pour un échantillonnage réel (temps d'échantillonnage = 485 min, débit = 2 L/min, volume d'échantillonnage = 0,97 m^3)

$$0,040 \mu\text{g/ml} * 1,5 \text{ ml} = 0.060 \mu\text{g}$$

$$0,060 \mu\text{g} / 0,97 \text{ m}^3 = 0,058 \mu\text{g/m}^3$$

APPENDICE D

Courbes d'étalonnage pour les huit nitrosamines étudiées (Conditions chromatographiques Tableau 3.6)

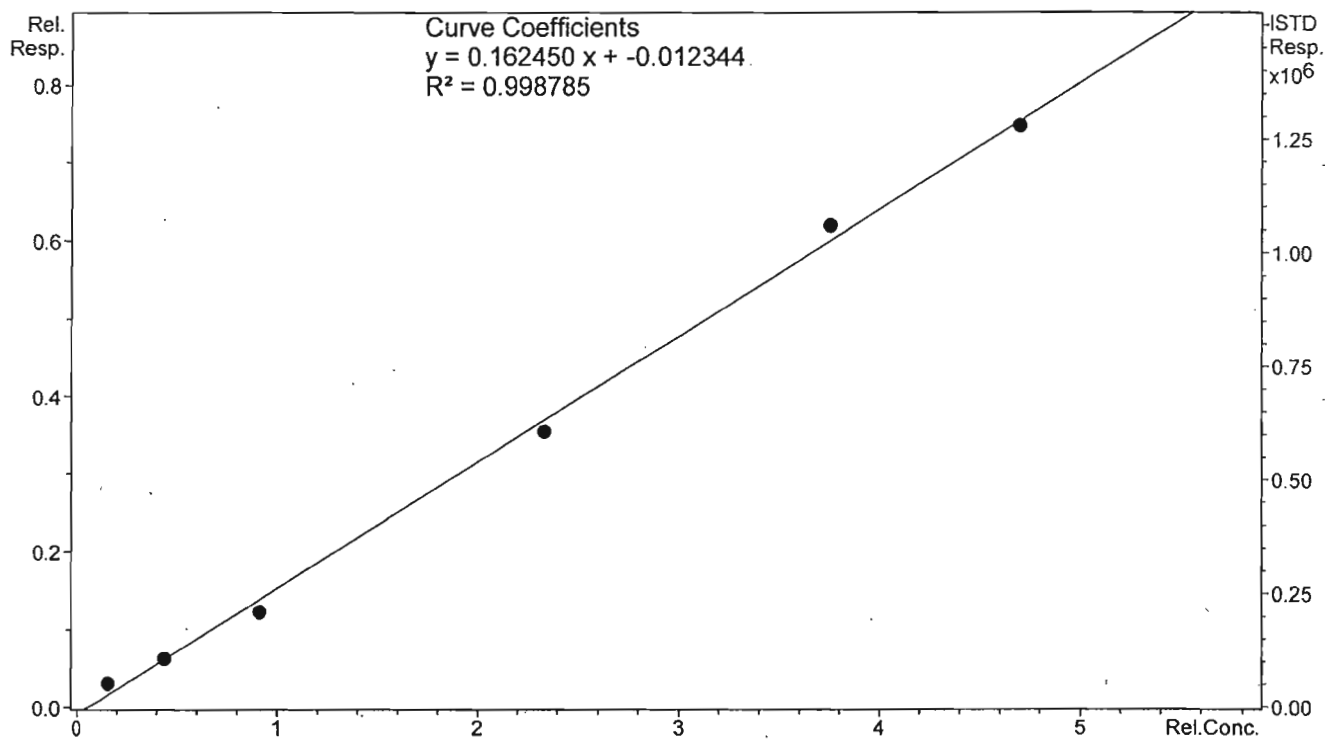
QuantAnalysis Summary Report (ISTD)

Compound: NDMA

#	File Name	Theor. Conc	RT Target Cmpd	Area ISTD Cmpd	Area Target Cmpd	Ratio Area Target/ISTD	Calc. Conc.	Accuracy
1	10032210.D	40.0 ng/mL	80.90	1225411	41296	0.03370	60.2 ng/mL	150.5
2	10032211.D	100.0 ng/mL	80.82	1127395	73580	0.06527	101.5 ng/mL	101.5
3	10032212.D	200.0 ng/mL	80.81	1032741	129063	0.12497	179.5 ng/mL	89.8
4	10032213.D	500.0 ng/mL	80.67	1146591	407746	0.35562	481.1 ng/mL	96.2
5	10032214.D	800.0 ng/mL	80.68	1012316	626660	0.61904	825.5 ng/mL	103.2
6	10032215.D	1000.0 ng/mL	80.57	1021244	762362	0.74650	992.2 ng/mL	99.2

QuantAnalysis Summary Report (ISTD)

Calibration No. 1 NDMA



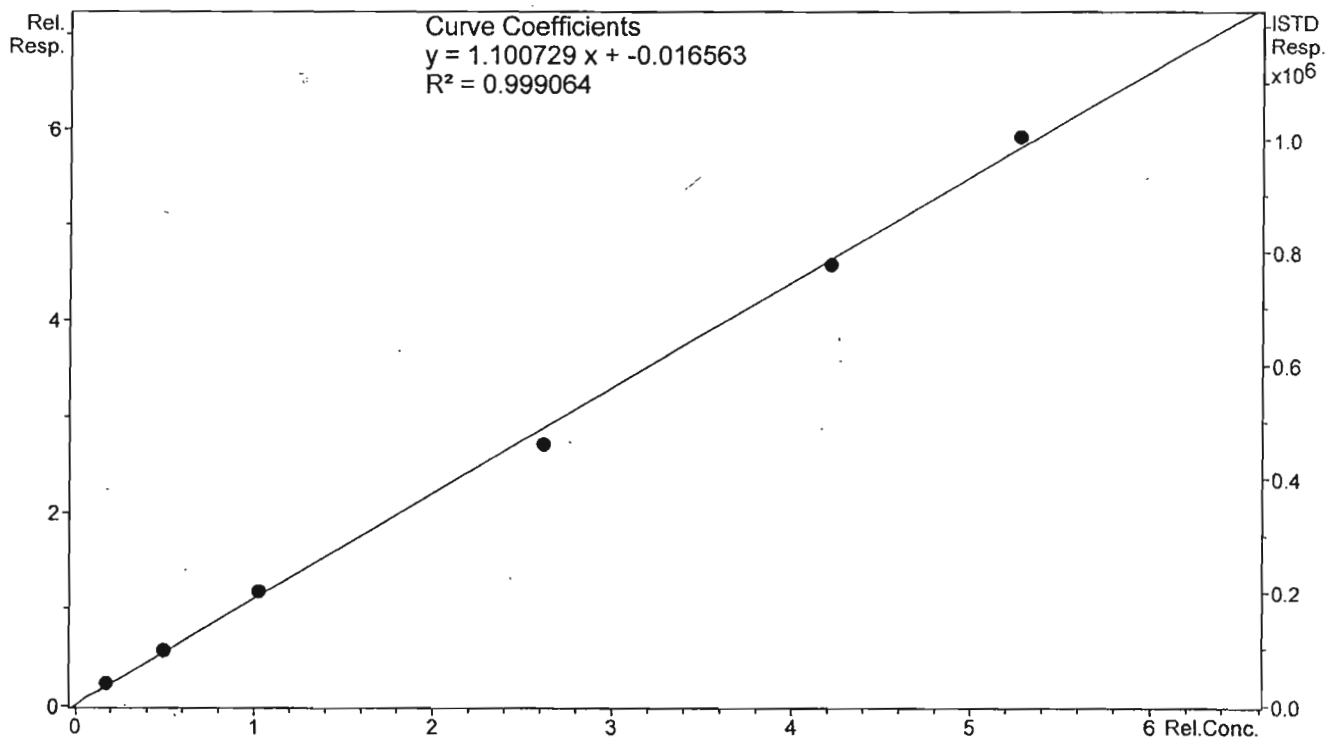
QuantAnalysis Summary Report (ISTD)

Compound: NDPA

#	File Name	Theor. Conc	RT Target Cmpd	Area ISTD Cmpd	Area Target Cmpd	Ratio Area Target/IS TD	Calc. Conc.	Accuracy
1	10032210.D	40.0 ng/mL	762.28	980505	245688	0.25057	45.9 ng/mL	114.9
2	10032211.D	100.0 ng/mL	764.24	957764	566471	0.59145	104.6 ng/mL	104.6
3	10032212.D	200.0 ng/mL	761.57	848888	1014321	1.19488	208.3 ng/mL	104.2
4	10032213.D	500.0 ng/mL	762.69	914037	2487534	2.72148	470.9 ng/mL	94.2
5	10032214.D	800.0 ng/mL	761.56	816307	3738100	4.57928	790.4 ng/mL	98.8
6	10032215.D	1000.0 ng/mL	761.87	881861	5215195	5.91385	1019.9 ng/mL	102.0

QuantAnalysis Summary Report (ISTD)

Calibration No. 1 NDPA



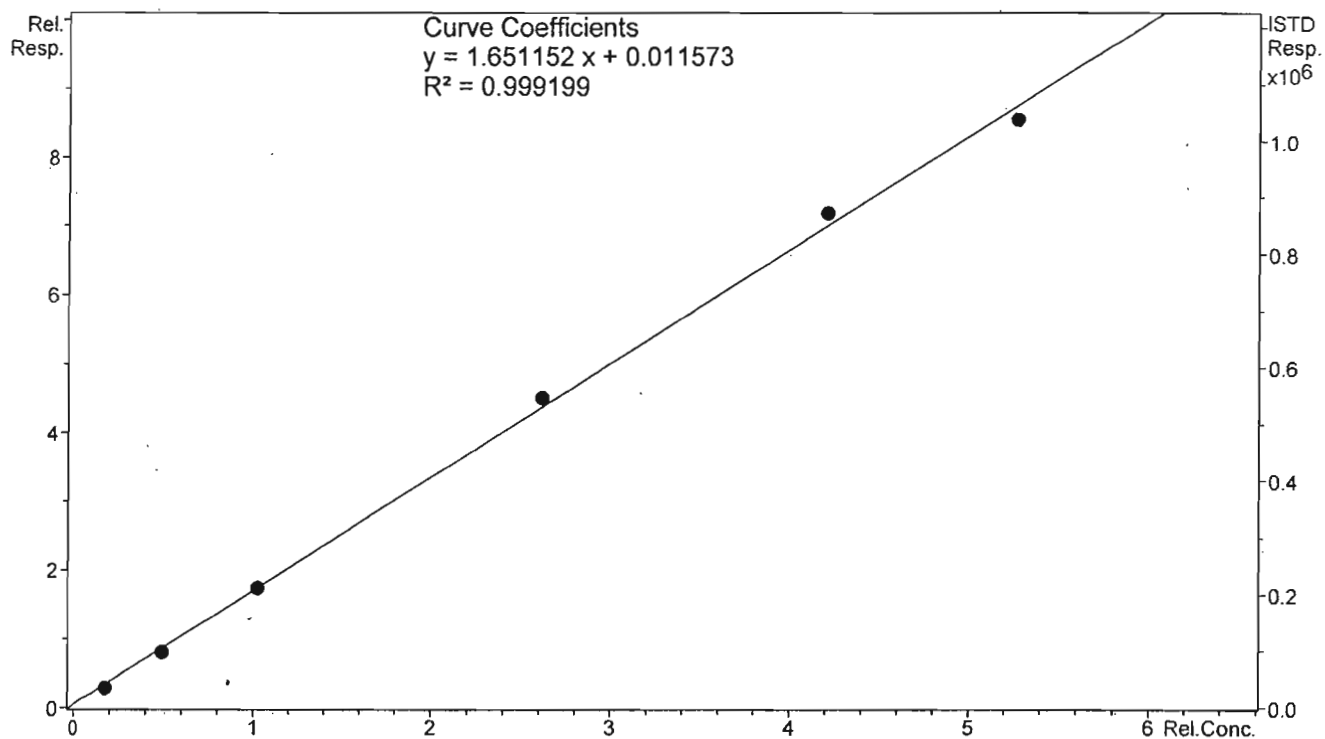
QuantAnalysis Summary Report (ISTD)

Compound: NPIP

#	File Name	Theor. Conc	RT Target Cmpd	Area ISTD Cmpd	Area Target Cmpd	Ratio Area Target/ISTD	Calc. Conc.	Accuracy
1	10032210.D	40.0 ng/mL	599.25	980505	302283	0.30829	34.0 ng/mL	85.0
2	10032211.D	100.0 ng/mL	601.37	957764	788873	0.82366	93.1 ng/mL	93.1
3	10032212.D	200.0 ng/mL	599.31	848888	1493657	1.75954	200.4 ng/mL	100.2
4	10032213.D	500.0 ng/mL	597.91	914037	4117599	4.50485	515.1 ng/mL	103.0
5	10032214.D	800.0 ng/mL	596.49	816307	5850069	7.16651	820.3 ng/mL	102.5
6	10032215.D	1000.0 ng/mL	598.04	881861	7525583	8.53375	977.0 ng/mL	97.7

QuantAnalysis Summary Report (ISTD)

Calibration No. 1 NPIP



RÉFÉRENCES

- Agilent Technologies, Guides de sélection des colonnes Agilent pour la CLHP (2009). p 23.
- Bretschneider K, et Matz J. (1974). Nitrosamines (NA) in the atmospheric air and in the air at the places of employment (author's transl), Arch Geschwulstforsch. 43(1), p.36-41.
- Bulushi A.I, Poole S, Deeth H.C, et Dykes G.A. (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation--a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 49(4), p. 369-77.
- Canadian Environmental Protection Act (CEPA). (1999). Priority substances list assessment report – Nnitrosodimethylamine (NDMA). Ottawa, Ontario : Minister of Public Works and Government Services.
- Cassinelli, M.A., et O'Connor, P.F. (1994). *NIOSH manual of analytical methods (NMAM). 4e édition*. DHHS (NIOSH) Publication 98-119. National Institute for Occupational Safety and Health. Cincinnati, USA.
- Castonguay A, Stoner G.D, Schut H.A, et Hecht S.S, (1983). Metabolism of tobacco-specific N-nitrosamines by cultured human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 80(21), p.6694-7.
- Désenfant, M. et Priel, M. De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure, Laboratoire National d'Essais, BNM-LNE, Paris.
- Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, et Schmahl D (1967). Organotropic carcinogenic effects of 65 various N-nitroso- compounds on BD rats. Z Krebsforsch 69(2), p. 103-201.
- Dutch Expert Committee on Occupational Standards, Committee of the Health Council of the Netherlands, Nnitrosodimethylamine (1999): Health based calculated occupational cancer risk values. The Hague: Health Council of the Netherlands, 1999; *publication no.1999/12OSH*. ISBN 90-5549-298-1No.1999/12OSH, The Hague, 1999.
- Fadlallah, S., Cooper, S.F., Perrault, G., Truchon, G., et Lesage, J. (1996). N-nitroso compounds in the ambient air of metal factories using metal-working fluids. *Bull Environ Contam Toxicol*. 57(6), p.867-874.

- Fan TY, Krull I.S, Ross R.D, Wolf M.H et Fine D.H. (1978). Comprehensive analytical procedures for the determination of volatile and non-volatile, polar and non-polar N-nitroso compounds. IARC Sci Publ. 19, p. 3-17.
- Fine D.H, Ruffe F, Lieb D, Rounbehler D.P. (1975). Description of the thermal energy analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds. *Anal. Chem.* 47 (7). p 1188–1191
- Fine, D.H, Firooz R., Lieb D. et Rounbehler D.P. (1975) Description of the thermal energy analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds. *Anal. Chem.* 47, p. 1188-1191.
- Fuchs, J, Burg J, Hengstler J.G, Bolm-Audorff U et Oesch F (1995). DNA damage in mononuclear blood cells of metal workers exposed to N-nitrosodiethanolamine in synthetic cutting fluids. *Mutation Research*, 342, p.95-102.
- Hajdasz, D. (1992). Analysis of N-nitrosamines in compounds. *Rubber World*. 205, p.15-17.
- HSE (Health and Safety Executive). (2010). A small survey of exposure to rubber process dust, rubber fume and N-nitrosamines. HSE's FIT3 Disease Reduction Programme Cancer Project.
- Iavicoli, I. et Carelli, G. (2006) Evaluation of occupational exposure to N nitrosamines in a rubber-manufacturing industry. *J Occup Environ Med.* 48(2):195-8.
- Incavo, J. A. et Schafer M.A. (2006) Simplified method for the determination of N-nitrosamines in rubber vulcanizates. *Anal Chim Acta.* 557, p.256-261.
- Institut de National de Recherche Scientifique (INRS). (2007). N-nitrosamine volatiles. Fiche 031/V01.
- Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). (2010). Évaluation du risque de cancer pour les travailleurs oeuvrant dans le secteur de l'entreposage de produits en caoutchouc en Estrie, dû à la présence de nitrosamines dans l'air ambiant. Direction des risques biologiques et de la santé au travail et Direction de la santé environnementale et de la toxicologie. p. 1-18.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1978). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 17, Some N-Nitroso Compounds, Lyon, IARCPress, p. 77–82.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1985). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 37, Tobacco

- Habits Other than Smoking: Betel-Quid and Areca-Nut Chewing; and Some Related Nitrosamines, Lyon, IARCPress, p. 73–74.
- IRSST (Institut de Recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail). (2008). Développement de méthode d'analyse de nitrosamine par CG-DAP. Méthode IRSST 99-561.
- IRSST (Institut de Recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail). (2009). Développement, mise au point et validation d'une méthode analytique, Fiche I-G-020 version 03.
- Jeansonne, M.S, et Foley J.P. (1991). Sequential multimodal elution for pseudomultidimensional liquid chromatography on a single column. *Anal. Chem.* 63 (1), p 33–44
- Klüber, H.D, et Conrad, R. (1998). Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 25,p. 301–318.
- Laliberté, C. et Aubin, S. (2008). Développement exploratoire d'une méthode d'analyse de nitrosamine par CLHP-MS. (Non publié).
- Liteplo R.G, et Meek M.E.(2002). N-nitrosodimethylamine. International Programme on Chemical Safety. 38, p. 45.
- Lunn G, Sansone E.B, et Andrews A.W. (1991). Aerial oxidation of hydrazines to nitrosamines. *Environ Mol Mutagen*.17(1). p.59-62.
- Magee, P. (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Medical Journal*. 10, p.114-122.
- Magee, P. N. et Barnes, J. M. (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer* 10, p.114-122
- Magee, P., et Schoental, R. (1964). Carcinogenesis by nitroso compounds. *British Medical Bulletin*. 20, p.102-106.
- Magee, P.N, et Barnes, J.M. (1967). Carcinogenic nitroso compounds. *Adv.Cancer*. 10, 163 p.
- Mesplède, J. et Randon, J. (2004). 100 manipulations de chimie générale et analytique. Editions Bréal, 249 pages.
- Meyer, V. (2004). Practical high-performance liquid chromatography, John Wiley and Sons, 357 pages.

- Mirvish, S.S, (1975). Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Pharmacol.* Eppley Insittute for Research in Cancer, University of Nebraska Medical center, Omaha. 31, p.325-351.
- National Institute for Occupational Safety and Health, U.S. (1977). NIOSH Manual of Analytical Methods. Department of Health Education, and Welfare, Publ. (NIOSH). 1, P. 77-157-A .
- National Institute for Occupational Safety and Health, U.S. (1994). Nitrosamines. NIOSH METHOD 2522, 2, p.4.
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA). (1985). Volatile Nitrosamine Mixture I. Organic Methods Evaluation Branch. Occupational Safety and Health Administration, U.S (OSHA) Analytical Laboratory, Method 27. [en ligne], www.osha.gov.
- Okun, J.D, et Archer, M.C. (1976). Micellar catalysis of nitrosamine formation. IARC Sci Publ. 14, p. 147-151.(1
- Oury B, et Protois J.C. (1997). N-nitrosamines volatiles dans l'industrie du caoutchouc. Service évaluation et prévention du risque chimique, centre de recherche INRS. Cahier de note documentaires-Hygiène et sécurité du travail #168.
- Oury B, Limasset J.C, et Protois J.C. (1997). Assessment of exposure to carcinogenic N - nitrosamines in the rubber industry. International Archives of Occupational and Environmental Health. 70 (4). p.261-271.
- Preussmann, R. (1983). Public health significance of environmental N-nitroso compounds. *IARC scientific publications*. 45, p. 3-17.
- Preussmann, R. (1984). Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften* 71(1), p25-30.
- Protois, J.C, et Oury, B. (1999). Prélèvement et dosage des nitrosamines volatiles en milieu industriel. *Annales des falsifications*. 92(946), p.17-24.
- Reed, P.I, (1981). Effect of Cimetidine on Gastric Juice N-nitrosamine Concentration. *The Lancet*, 2, p. 553-556.
- Reichl, F.X, (1984): Guide pratique de toxicologie, deuxième édition. Editeur De Boeck et Larcier s.a. p. 120.

- Scarselli A, Scano P, Marinaccio A, et Lavicoli S. (2006). Occupational cancer in Italy: Evaluating the extent of compensated cases in the period 1994–2006. *American Journal of Industrial Medicine*. 52 (11), p. 859–867.
- Schuster, R.H. (1994). Determination of nitrosamines in elastomers and vulcanizates based on methanol extraction. *Nitrosamine Res Rubber Ind , One-Day Int Symp*. p.1-8.
- Shank R.C, et Newberne P.M.(1976). Dose-response study of the carcinogenicity of dietary sodium nitrite and morpholine in rats and hamsters. *Food Cosmet Toxicol*. 14(1), p.1-8.
- Shank, R.C, et Archer, M.C. (1974). Formation of N-nitrosopyrrolidine in a dog's stomach. Department of Nutrition and Food Science. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge. 30, p.279.
- Sheweita S.A, et Mostafa M.H. (1996) N-nitroso compounds induce changes in carcinogen-metabolizing enzymes. *Cancer letters*. 106(2), p 9-243.
- Sheweita, S. (2010). N-Nitroso compounds induce changes in carcinogen-metabolizing enzymes. *Cancer letters*. 106, p.243-249.
- Skoog, D.A., Holler F.J. et Nieman T.A. (2003). Principes d'analyse instrumentale, De Boeck Université, 968 pages.
- Spiegelhalder B. et Preussmann R. (1982). Nitrosamines and rubber. *IARC Sci Publ*. 41, p.231-43.
- Stellman J. M et Dufresne C. (2000).Encyclopédie de sécurité et de santé au travail.International Labour Organization. 4. p. 104.
- straif K., Weiland S.K., Werner B., Chambless L., Mundt K.A. et Keil U. et al,. (1998). Workplace risk factors for cancer in the German rubber industry: Part 2. Mortality from non-respiratory cancers. *Occup Environ Med*. 55. p. 325-332.
- Timerbaev A.R, Semenova O.P, Tsoi I.G et Petrukhin O.M. (1993). Correlation analysis in liquid chromatography of metal chelates: III. Multi-dimensional models in reversed-phase liquid chromatography . *Journal of Chromatography A* 648 (2). p 307-314
- Tricher, A.R. (1997). N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev*. 6(3). p.226-68.

University of Bristol, Organic Geochemistry Unit (OGU), Bristol Biogeochemistry Research Centre, School of Chemistry High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS) (2005).